

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Bc. Vlasta MATUŠKOVÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza a studium biologické aktivity nových purinových 9-(β)-D-nukleosidů

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie N1407

Vedoucí práce: **RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.**

Olomouc 2016

*Věnováno mé milované mamičce,
která v nedávné době navždy opustila tento svět.*

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

V Olomouci 11. 5. 2016

.....

Podpis

Na tomto místě děkuji především RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícný přístup v průběhu vypracovávání této diplomové práce. Dále děkuji RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. a Františku Škařupovi za rady a pomoc při laboratorních úkonech a také celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, zejména Mgr. Evě Řezníčkové a Mgr. Zuzaně Mičkové a kol. za testování biologické aktivity. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu ve studiu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Vlasta Matušková
Název práce:	Syntéza a studium biologické aktivity nových purinových 9-(β)-D-nukleosidů
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů, Centrum regionu Haná, Šlechtitelů 11, Olomouc
Školitel:	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Školitel-konzultant:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Práce je zaměřena na syntézu N^6-substituovaných derivátů 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu jako potenciálních cytokininových derivátů, protinádorových a antivirotických léčiv. Teoretická část práce je rešerší problematiky purinových cytokininů, nukleosidových protinádorových léčiv, antivirotik a popisuje také základní přístupy syntézy nukleosidů. Experimentální část pak shrnuje přípravy nových derivátů a výsledky biologického testování.
Klíčová slova:	cytokininy, cytokininová signalizace, rakovina, protinádorová léčiva, antivirotika, nukleosidy, ribosidy, 2'-deoxy-9-(β)-D-nukleosidy
Počet stran:	117
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Bc. Vlasta Matušková
Title:	Synthesis and biological activity of novel purine 9-(β)-D-nucleosides
Type of thesis:	Master thesis
Department:	Laboratory of Growth Regulators, Centre of Region Haná, Šlechtitelů 11, Olomouc
Advisor:	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Advisor-consultant:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
The year of presentation:	2016
Abstract:	This work is focused on synthesis of novel N^6-substituted 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurine derivatives as potencial cytokinin, anticancer and antiviral drugs. Theoretical part of this work is a summary of issues such as purine cytokinins, nucleoside antiproliferative drugs and antiviral agents. It also contains synthetic approaches in nucleoside chemistry. Experimental part involves syntheses of 14 novel nucleoside derivatives and results from biological testing.
Keywords:	cytokinins, cytokinin signalization, cancer, anticancer drugs, antiviral drugs, ribosides, 2'-deoxy-9-(β)-D-nucleosides
Number of pages:	117
Number of appendixes:	0
Language:	Czech

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce	10
3. Teoretická část	11
3.1 Cytokininy.....	11
3.1.1 Cytokininy, jejich cytokininová a protinádorová aktivita	11
3.1.2. Cytokininová signalizace	12
3.1.3 Deriváty cytokininů a jejich vliv na cytokininové receptory a nádorové linie	14
3.2. Nukleosidy a nukleosidová analoga.....	17
3.2.1 Nukleosidový transport.....	19
3.2.2 Nukleosidová analoga k terapii proliferativních onemocnění	22
3.2.3. Analoga purinových nukleosidů	22
3.2.4 Pyrimidinová nukleosidová analoga a nukleobáze.....	26
3.2.5 Strategie ke zlepšení účinnosti nukleosidových léčiv.....	32
3.3.6 Rezistence	32
3.3 Antivirotika	36
3.3.1 Viry	36
3.3.2 Nukleosidová a nenukleosidová antivirotika s převážně anti-HIV aktivitou	39
3.3.3 N^6 -benzylamino-2'-deoxy-9- β -D-ribofuranosylpurin	55
3.4 Základní principy syntézy ribosidů a 2'-deoxyribosidů.....	56
4. Diskuze a výsledky	70
5. Experimentální část.....	78
5.1 Syntéza	79
5.2 Výsledky studia biologické aktivity.....	98
6. Závěr	100
7. Seznam zkratk.....	101
8. Seznam použité literatury	105

1. Úvod

Slovo „chemoterapie“ použil poprvé na počátku dvacátého století známý německý chemik Paul Ehrlich a definoval jej jako „využití chemikálií k léčbě nemoci“.^[1-3] Počátky využití chemoterapie k léčbě rakoviny se datují rovněž do začátku dvacátého století, kdy byla snaha zúžit spektrum sloučenin, které by mohly mít vliv na vývoj nemoci, jejich screeningem s využitím transplantace nádorů do hlodavců. První transplantabilní systém tehdy vyvinul George Clowes.^[4-11] Do šedesátých let dominovala léčba rakoviny chirurgická a radioterapeutická cesta, která ovšem nemohla řešit problém metastáze. Možnost léčit akutní dětskou leukémii a pokročilá stadia Hodgkinových lymfomů s využitím chemoterapie v šedesátých letech a na počátku sedmdesátých let překonala silný pesimismus týkající se terapie pokročilého nádorového onemocnění. Prvním programem, který dovoľoval screening většího množství látek (přes 3000) v mezinárodním měřítku byl Shearův program (1935), z nějž ovšem nevzešlo žádné terapeutikum^[7]. V roce 1939 započala éra hormonální terapie, kterou odstartoval Charles Huggins (na základě vlivu estrogenů na rakovinu prsu popsaném Beatsonem^[12] v roce 1896), když léčil hormony muže s rakovinou prostaty^[13].

Hitchings a Elion vyvinuli roku 1951 dva deriváty (6-thioguanin a 6-merkaptopurin), které byly využívány nejen k léčbě akutní leukémie, ale také při infekcích herpes virů a jako imunosupresivum během transplantací.^[14,15] Za to obdrželi Nobelovu cenu v roce 1988. V polovině padesátých let Charles Heidelberger a kolektiv na Wisconsinské univerzitě vyvinuli léčivo cílené na léčbu nehematologických nádorů na základě pozorování vyšší spotřeby uracilu v hepatomu potkana oproti jeho zdravé tkáni.^[16] Takto vznikl 5-fluorouracil (5-FU) využívající se do dnešních dní k léčbě nádorů tlustého střeva.

Nukleosidová analoga jsou již skoro 50 let součástí klinické terapie pacientů s nádorovými či virovými onemocněními. Nicméně v oblasti nukleosidové chemie je stále potenciál v objevování nových poznatků a i nadále jsou vyvíjeny nové deriváty s cílem poskytnout lepší terapeutický účinek a méně negativních vedlejších účinků.

Jelikož některé deriváty cytokininů vykazují také nezanedbatelnou protinádorovou aktivitu *in vitro* a jelikož se v řadě případů jedná rovněž o nukleosidové sloučeniny,

nemohou být opomenuty v teoretické části této práce a spolu se základními informacemi o známých a užívaných nukleosidových derivátech s protinádorovými a antivirotickými účinky tvoří její ucelenou podobu.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je podat komplexní rešerši zabývající se problematikou nukleosidových derivátů jak v oblasti purinových cytokininů, tak nukleosidových antiproliferativních léčiv. Dalším cílem je mimo jiné také studium nukleosidových analog využívajících se k léčbě virových onemocnění a souhrn vybraných významných syntetických postupů přípravy nukleosidových derivátů.

Dále pak je předmětem této práce příprava řady nukleosidových derivátů, konkrétně různě ***N*⁶-substituovaných 9-(β)-D-2'-deoxyribofuranosylpurinů**. K *N*⁶-substituci byly vybrány na benzenovém jádře různě substituované deriváty benzylaminu. Jak je v teoretické části práce popsáno, ***N*⁶-benzylaminopurin** vykazuje významné cytokininové účinky, jeho (β)-D-ribosid zase cytotoxické účinky vůči nádorovým liniím a v této práci připravovaným *N*⁶-substituovaných 9- β -D-2'-deoxyribofuranosylpurinům nejvíce příbuzný analog, ***N*⁶-benzylamino-9-(β)-D-2'-deoxyribofuranosylpurin**, vykazuje zajímavé antivirotické účinky.

Připravené deriváty je v plánu podrobit biologickému testování cytokininové, protinádorové a antivirotické aktivity.

3. Teoretická část

3.1 Cytokininy

3.1.1 Cytokininy, jejich cytokininová a protinádorová aktivita

Cytokininy jsou deriváty purinu, konkrétně N^6 -substituované adeniny a jejich ribosidy, ribotidy a glykosidy, významné zejména pro rostliny, u nichž zastupují hormonální funkci a podílí se na řízení mnoha procesů, ať už se jedná o tvorbu pupenů, růst rostlin, řízení apikální dominance, růst a tvar listů nebo o vznik chloroplastů, tvorbu semen či samotné stárnutí rostliny v závislosti na environmentálních podmínkách. [17-19].

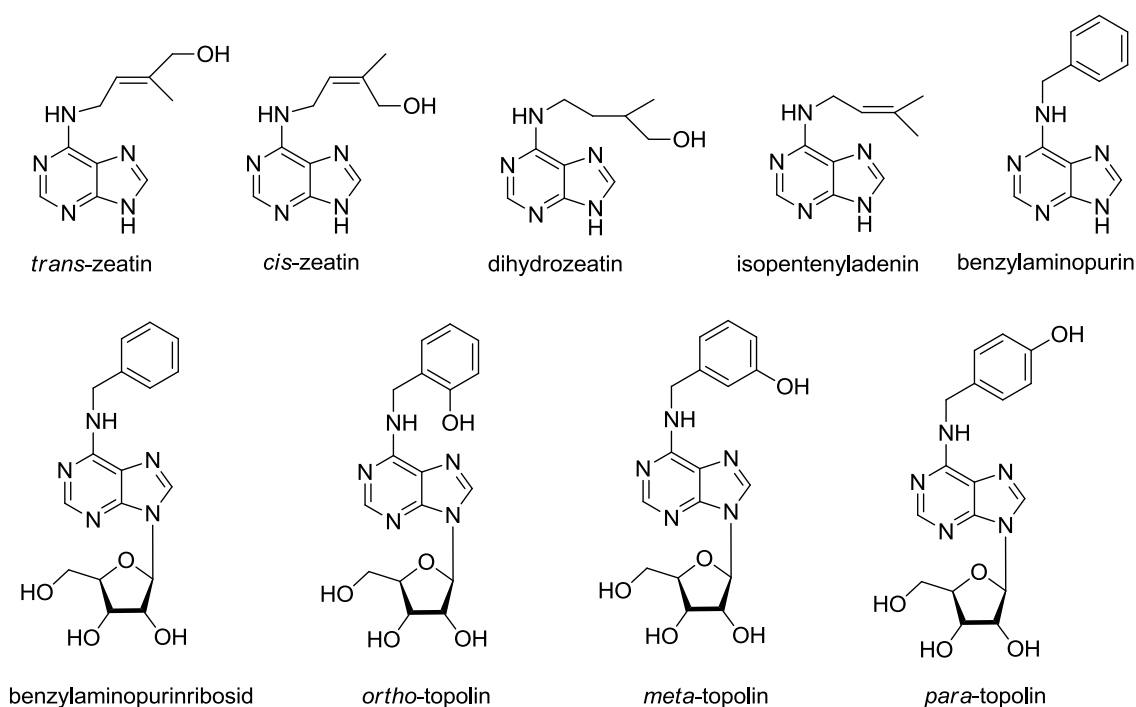
Cytokininy byly objeveny jako faktory podporující buněčné dělení buněk tkáně tabáku^[20] a jsou schopny indukovat rediferenciaci kalusu v adventivní pupeny^[21]. Kalus je tvořen clustery dediferencovaných buněk, které se chovají obdobně jako buňky karcinomu a mohou ovlivnit proliferaci a diferenciaci lidských nádorových buněk signálními transdukčními systémy^[22].

V závislosti na N^6 -substituentech dělíme cytokininy na isoprenoidní a aromatické a tato substituce ovlivňuje jejich biologickou aktivitu^[23]. Nejznámějšími jsou **zeatin** a **isopentenyladenin (iP)**, ale jejich výskyt závisí na druhu rostliny a stádiu jejího vývoje. Například **trans-zeatin** a iP se vyskytují především v *A. thaliana*, **cis-zeatin** v rýži, cizrně a kukuřici.^[24] Cytokininy s aromatickou substitucí jsou **BAP**, **kinetin** a **o- a m-topolin**.^[25,26] Mnoho experimentálních dat ukázalo silné antioxidační vlastnosti kinetinu, nacházejícího se například v kapalném endospermu čerstvých kokosových ořechů^[25], které dokážou ochránit DNA před oxidativní destrukcí při Fentonově reakci^[27].

Nepurinové cytokininy jsou největší skupinou syntetických sloučenin s cytokininovou aktivitou^[28] obsahující podskupiny: benzimidazoly, pyrimidiny, O-6-substituované deriváty hypoxanthinu a guaninu a aromatické deriváty močoviny.

Jediným známým cytokininem vyskytujícím se v živočišné říši je N -(Δ^2 -isopentenyl)adenosin (iPA), jenž byl detekován v cytosolu mnoha eukaryotních a prokaryotních buněk jako volná báze nebo vázán k tRNA.^[29] U savců je tRNA-isopentenyltransferáza domnělý tumor-supresor.^[30]

Obrázek 1: Chemická struktura některých cytokininů a jejich ribosidů



3.1.2. Cytokininová signalizace

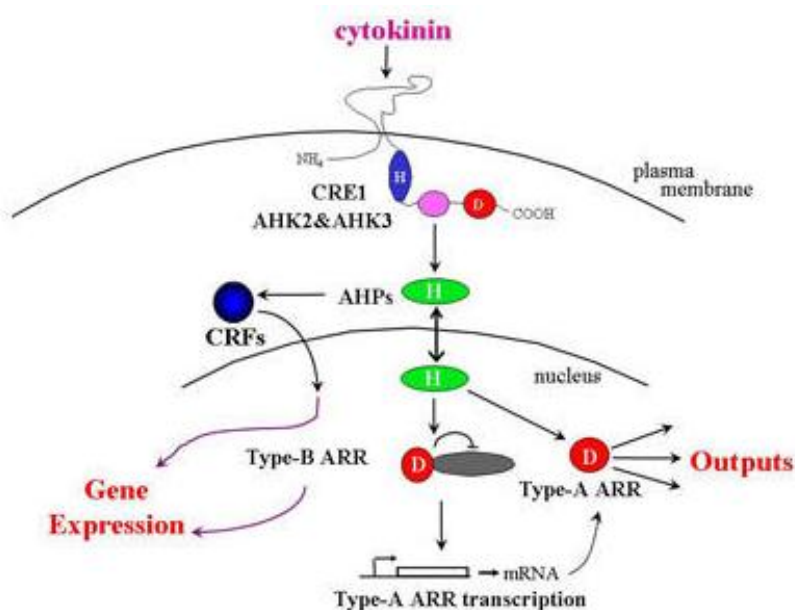
Zdá se, že všechny děje ovlivněné cytokininy, včetně programované buněčné smrti, jsou zprostředkovány speciální signální dráhou, jež využívá histidin-kinázové receptory (HKs), histidin-fosfotransferové proteiny (HPs) a regulátory odpovědi („response regulators“, RRs)^[31]. U prototypického dvousložkového modelu se receptory skládají ze dvou proteinů, sensorového a RR proteinu. Aktivní formou jsou homo- nebo heterodimerické kombinace. Sensorový protein je složen ze dvou domén: externí a interní. Externí doména je zodpovědná za vazbu ligandu a vjem signálu^[32], zatímco interní doména (HPs) podléhá autofosforylaci a následně přenáší fosforylovou skupinu na RRs, např. aktivátor či represor v jádře, kde může způsobit změny v buněčné fyziologii pomocí genové exprese^[33].

Cytokininové signály jsou přijímány extracelulární vstupní doménou hybridního (hybridní, protože histidinové kinázy obsahují přídavnou přijímací doménu) HK receptoru - CHASE doménou^[34]. Po vazbě ligandu podléhá vnitřní histidinová doména receptoru autofosforylaci a fosforylová skupina je transportována na aspartát-histidinový zbytek přijímací domény histidinového receptoru, potom je fosforylová skupina přenesena pomocí HP na aspartát v *N*-terminální části přijímací domény RR^[35].

Výstupní domény RR, GARP domény, jsou aktivovány po fosforylaci přijímací domény a jsou často zapojeny do indukce jaderných signálních komponent^[36].

Multikrokový systém cytokininové signalizace je dobře znám u *A. thaliana*, kde existují tři *A. thaliana* HKs (AHK2, AHK3, CRE1/AHK4), které jsou odpovědné za příjem cytokininových signálů^[37] a vyskytují se převážně v endoplazmatickém retikulu i plazmatické membráně^[38]. Mimo jiné jsou popsány také tři HPs u této rostliny: AHP1, AHP2 a AHP5, které zprostředkovávají přenos fosforylové skupiny mezi HKs a ARR^[39]. AHPs fungují jako pozitivní regulátory CK signalizace^[40] a vyskytují se jak v cytoplazmě, tak v jádře^[41]. Konečně RRs podílející se také na příjmu a přenosu signálů jsou rozděleny do čtyř podskupin: typ A, typ B, typ C a APRRs (Arabidopsis pseudo RRs), z nichž regulátory typu A a B jsou zapojeny v cytokininové signalizační dráze^[42]. ARR^s typu A (ARR^s) jsou složené z deseti malých proteinů, které nesou přijímací doménu s Asp-reziduem a krátkou C-terminální výstupní doménu. ARR^s fungují jako primární transkripční cíle cytokininů – jejich transkripty jsou po podání cytokininů rychle akumulovány^[42]. Většina ARR^s byla lokalizována v jádře a hovoří se o nich jako o negativních regulátorech cytokininové signalizace^[43]. ARR^s typu B se skládají z jedenácti RRs a mají delší C-terminální přijímací doménu než ARR^s typu A^[44] vázající se s DNA a trans-aktivujícím motivem^[43]. Hrají roli pozitivních regulátorů cytokininové signalizace, které hlídají transkripci mnoha cytokininu regulovaných cílů včetně indukce ARR^s typu A^[43,45].

Obrázek 2: Model cytokininové signalizace^[46]



3.1.3 Deriváty cytokininů a jejich vliv na cytokininové receptory a nádorové linie

Programovaná buněčná smrt je proces, který je nezbytný pro všechny mnohobuněčné organismy rostlinné i živočišné říše a u rostlin je běžný během tvorby semen, vývoje rostliny i senescence.^[47-50] Dva přirozené cytokininy (kinetin a benzylaminopurin) jsou ve vysokých koncentracích schopny indukovat programovanou buněčnou smrt u rostlin *in vivo* a BAP je toho navíc schopen i u rostlinných kultur *in vitro*, kdežto kinetin pouze u živých rostlinných tkání.^[47,48,51]

Kinetinem vyvolaná apoptóza postihuje u rostlin (*Vicia faba* ssp. *Minor*) buňky kůry kořene^[47,52], ale nepostihuje lidské či zvířecí buňky^[53,54]. Kinetin také snižuje délku a šířku kořenů, vyvolává tvorbu kyselých vakuol a kyslíkových radikálů a snížení Ca^{2+} iontů^[52]. Zeatin nevyvolává programovanou buněčnou smrt ani u *A. thaliana* ani u *D. carota*.

Je nutno zde brát v potaz rozdílnou chemickou strukturu BAP, zeatinu a kinetinu, která má vliv i na rozdílnou biologickou aktivitu.^[52,55,56]

Bylo zjištěno, že jeden z cytokininových receptorů *A. thaliana* (CRE1/AHK4) je zapojen do vzniku BAP-stimulovaného procesu apoptózy^[51] spíše, než zbylé dvě (AHK2 a AHK3). Benzylaminopurin je jeden z nejúčinnějších cytokininů využívajících se v mnoha mikropropagačních systémech, ale u některých rostlin způsobuje rozdílnosti v růstu a inhibici vývoje kořenů^[57]. Možným způsobem, jak tyto nevýhody eliminovat, je vývoj lépe biologicky dostupných BAP derivátů. Například u *meta*-topolinu (mT) byla popsána vyšší biologická dostupnost^[58,59], což bylo potvrzeno srovnáním růstu kořenů a klíčků *Spathiphyllum floribundum in vitro* na růstovém médiu s BAP a mT (při koncentraci 10 μM), kde rostliny kořenily mnohem lépe na médiu obsahujícím mT než na médiu s BAP. Důvodem jsou rozdíly v metabolismu těchto dvou cytokininů.^[57]

Doležal^[60] *et al.* připravili 38 derivátů BAP s různými substitucemi na benzenovém jádře, u nichž byla testována cytokininová aktivita, zejména senzitivita vůči AHK3 a CRE1/AHK4, a také protinádorová aktivita (HOS, HL-60, K-562, MCF-7, NIH-3T3, G-361, B16 a CEM). Zde bylo zjištěno, že cytokininovou aktivitu BAP překonaly nejvíce deriváty 2-fluoro-BAP a 3-fluoro-BAP. AHK4 receptor byl aktivován nejvíce deriváty 3-fluoro-BAP, 4-fluoro-BAP a 3-methoxy-BAP, ačkoliv s mnohem menší citlivostí v porovnání s *trans*-zeatinem. Protinádorová aktivita byla nejvíce zajímavá u derivátu

2-hydroxy-3-methoxy-BAP ($IC_{50} = 26,6 \mu\text{mol/l}$ pro MCF-7). Velmi podobné deriváty (2-hydroxy-4-methoxy-BAP a 2,3-dihydroxy-BAP) nevykazovaly aktivitu žádnou.

Cytokininové báze jsou schopny indukovat diferenciaci lidských buněk za relativně vysokých koncentrací cytokininu ($25\text{--}100 \mu\text{M}$), což bylo demonstrováno na keratinocytech^[61] a několika buněčných liniích leukémie, včetně HL-60 a K-562^[54]. Ovšem ribosidy těchto bází způsobují rychlou apoptózu u buněk leukémie a to již za mikro-molárních koncentrací, kdy dojde k vyčerpání ATP, aktivují se kaspázy a mitochondrie se depolarizují.^[62] Bylo zjištěno, že mikro-molární koncentrace cytokininu a jeho příslušného ribosidu může také u rostlinných buněk způsobit apoptózu.^[63] Voller *et al.* popsal přípravu a biologickou aktivitu 47 derivátů odvozených od cytokininů včetně jejich ribosidů a to i ve formě mono-, di- a trifosfátů.^[64] V tomto případě byl medián získaných hodnot IC_{50} na nádorových liniích pro oTR, BAR, KR a iPR 2,27, 4,15, 5,10 a 5,95, resp., tedy mnohem nižší, než u výše zmíněného BAP. Více tabulka č. 1.

Tabulka 1: Srovnání hodnot IC_{50} protinádorové aktivity příslušných cytokininových bází a jejich ribosidů⁶⁴

	CEM	HL- 60	K562	RPMI 82 26	HOS	MCF7	G361	HELA	BJ
BA	>166	>166	140	>166	>166	>166	>166	>166	>166
BAR	1,3	0,93	5,9	4,6	13,6	3,7	15,0	1,9	1,7
BARMP	1,1	0,95	3,7	5,3	14,4	5,0	>166	2,3	2,6
BARDP	2,0	1,3	4,0	4,5		8,0			
BARTP	2,3	4	3,9	4,7		11			
K	155	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166
KR	1,6	0,8	10,5	7,4	5,9	4,3	21,9	4,3	2,1
iP	92	>166	150	>166	>166	>166	>166	>166	>166
iPR	1,7	0,71	5,2	6,4	11,7	6,9	>166	5,5	2,5
oT	118	78	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166
oTR	0,5	0,6	2,4	1,5	3,1	7,7	11,6	2,13	1,5
mT	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166
mTR	>166	24	>166	>166	>166	>166	>166	>166	3,9
pT	>166	123	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166
pTR	>166	7,5	>166		>166	>166	>166	>166	15,3
tZ	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166

tZR	>166	95,9	>166	>166	>166	>166	>166	>166	
cZ	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166	>166
cZR	18,8	7,9	>166	>166	>166	>166	>166	42,3	55,2

Z uvedených hodnot by mohl vyplývat potenciál cytokininových ribosidů k léčbě nádorových onemocnění. Nicméně tak jako od báze BAP byly odvozeny na benzenovém jádře různě substituované deriváty^[60], byly připraveny také na benzenovém jádře různě substituované deriváty *N*⁶-benzylaminopurin-9(β)-D-ribosidu (BAR)^[65], které byly testovány na nádorových liniích.

Tabulka 2: Srovnání hodnot cytotoxicity GI₅₀ (μ mol/l) různě substituovaných derivátů adenosinu v poloze *N*⁶ na různých nádorových liniích^[65]

	HOS	K-562	MCF7	BJ	G-361	CEM	HL60
2-hydroxybenzylamino	2,5	4	10,5	43,2	13,5	1,3	0,48
3-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	51,9	23,7
4-hydroxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	39,7	9,5
2-methoxybenzylamino	21,2	11,2	>166,7	>166,7	>166,7	3,2	2,3
3-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7	7,6	4,9
2-chlorobenzylamino	>166,7	64	>166,7	>166,7		14,5	1,6
3-chlorobenzylamino	>166,7	30,4	>166,7	>166,7		1,6	0,75
4-chlorobenzylamino	>166,7	16,1	>166,7	>166,7		6,5	5,3
2-fluorobenzylamino	>166,7	33,2	>166,7			4,6	3,2
3-fluorobenzylamino	>166,7	7	16,6	>166,7	15,7	4	0,92
4-fluorobenzylamino	20	6,4	14	>166,7		1,5	0,86
2-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		14	3,3
3-methylbenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		19,1	6,4
2-bromobenzylamino	>166,7	10	>166,7	>166,7		12,3	6,6
3-bromobenzylamino	>166,7	19,7	>166,7	>166,7		5	8
4-bromobenzylamino	>166,7	68,2	>166,7	>166,7		20,6	47,7
2,4-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	39
2-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	11,7	>166,7	>166,7		20,9	9
3-chloro-4-fluorobenzylamino	>166,7	4,1	>166,7	>166,7		3,4	3,5
2,3-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		>166,7	109
2,4-dichlorobenzylamino	>166,7	85,7	126,9	>166,7		86,7	96,3
2,4-difluorobenzylamino	>166,7	7,4	>166,7	>166,7		7,1	3,4
2,3,4-trifluorobenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		58,2	13
3,4-dichlorobenzylamino	>166,7	6,5	88,8	>166,7		3	1,1
3,5-difluorobenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		24,5	9,1

3,5-dimethoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			18,8
2,3,6-trifluorobenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7			13
2-hydroxy-3-methoxybenzylamino	24,1	2,1	30,4	69,7	27,9	0,3	0,5
3-hydroxy-4-methoxybenzylamino	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7		79,3	68,9
2-hydroxy-5-methoxybenzylamino	6,4	15,4	21	87,9	12,3	0,9	0,54
2-hydroxy-5-chlorobenzylamino	10,6	15,7	18	63,4	12,5	0,6	0,47
2-hydroxy-5-fluorobenzylamino	9,1	13,4	16	58,7	10,7	0,5	0,53

Hodnoty cytotoxicity v této tabulce (tabulka č. 2) jsou u některých derivátů významné (např. 2-hydroxybenzylaminopurin-9(β)-D-ribosid, 2-hydroxy-3-methoxybenzylaminopurin-9(β)-D-ribosid, 4-fluoro-benzylaminopurin-9(β)-D-ribosid nebo 3-chloro-benzylaminopurin-9(β)-D-ribosid), a proto bylo předmětem práce v rámci experimentální části připravit právě tyto a další deriváty BAR nikoliv ve formě 9(β)-D-ribosidů, ale ve formě 9(β)-D-2'-deoxyribosidů a zjistit vliv 2'-hydroxyskupiny na cytokininovou aktivitu i cytotoxicitu cytokininového derivátu.

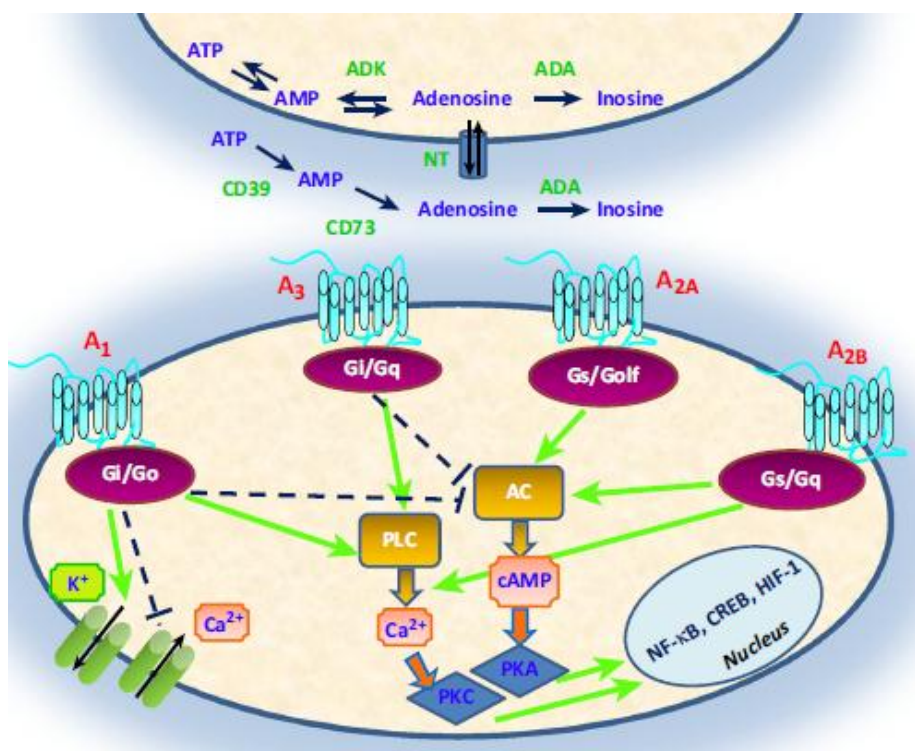
3.2. Nukleosidy a nukleosidová analoga

Mezi přirozeně se vyskytující nukleosidy patří purinové nukleosidy (adenosin, guanosin a inosin) a pyrimidinové nukleosidy (uridin, cytidin a thymidin). Nukleosidy hrají důležitou roli ve fyziologii buňky, kde tvoří metabolické prekurzory mnoha základních biologických molekul (např. DNA, RNA, ATP) a působí také jako signální molekuly a neuromodulátory. Žijící organismy si je dokážou *de novo* syntetizovat v adekvátním množství, ale ne všechny tkáně toto dovedou v potřebné míře, zejména buňky střevní sliznice, hematopoetické buňky kostní dřeně či buňky mozkové tkáně. Proto také obsah exogenních nukleosidů a nukleotidů je podstatný. V roce 1993 bylo například popsáno významné zvýšení rezistence myši vůči MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*), když jim byla intraperitoneálně podána směs nukleosidů a nukleotidů (23% inosin, 35% GMP.2Na, 21% cytidin, 16% uridin a 5% thymidin).^[66,67]

Adenosin je všudypřítomná molekula, která řídí funkčnost každé tkáně a orgánu^[68] zejména aktivací rodiny čtyř s G-proteinem spřažených membránových receptorů (GPCRs) A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 . Subtypy A_1 a A_3 mají inhibiční efekt na aktivitu adenylyl cyklázy (AC), naopak A_{2A} a A_{2B} ji stimulují a dochází ke změnám hladiny cAMP^[68]. Adenosin může být intracelulárně produkován hydrolýzou AMP nebo S-adenosyl-homocysteinu (SAH) intracelulární 5'-nukleotidázou nebo SAH hydrolázou, nicméně hlavním mechanismem způsobujícím vysoké hladiny extracelulárního adenosinu je

ATP defosforylace zprostředkovaná ekto-nukleosidtrifosfát difosfohydrolázou CD39 a 5'-nukleotidázou CD73^[68]. Biodostupnost adenosinu závisí na jeho transformaci na inosin za pomoci adenosindeaminázy (ADA), která je přítomna jak intracelulárně, tak extracelulárně a také na intracelulárním transportu nukleosidovými transportéry (NTs), jelikož nukleosidy jsou hydrofilní molekuly a jejich pasivní transport přes biologické membrány je omezený. V buňce je adenosin buďto fosforylován na AMP, nebo je degradován na inosin adenosinkinázou a adenosindeaminázou. Tvorba adenosinu je závislá na metabolickém stavu buňky. U normální zdravé buňky je koncentrace extracelulárního adenosinu v nanomolárním rozsahu, ale roste za podmínek vyšších metabolických požadavků a při nízkém přísunu kyslíku, například patologické stavy jako je epilepsie, ischemie, bolest, zánět nebo rakovina^[69]. A v těchto případech se adenosin snaží „odvetně“ napravit nerovnováhu mezi energetickými požadavky a dostupností^[69] a ochraňuje tkáň a funkci orgánů zvýšením nebo rebalancí dodávky kyslíku spuštěním protizánětlivé reakce a stimulací angiogeneze^[70].

Obrázek 3: Schematické znázornění metabolismu adenosinu a adenosinových receptorů^[71]



A₁ a A₃ subtypy inhibují aktivitu AC a indukují stimulaci PLC. A₁ receptory také ovlivňují K⁺ a Ca²⁺ kanály. A_{2A} a A_{2B} receptory stimulují AC s následným zvýšením hladiny cAMP a A_{2B} receptory aktivují PLC, což vede ke zvýšení hladiny Ca²⁺. Regulace PAK a PKC spouští

signalizaci, která může ovlivnit transkripci genů majících vliv při zánětech a buněčné regulaci, např. NF- κ B, CREB a HIF-1.

Zkratky: AC adenylylcykláza; ADA adenosindeamináza; ADK adenosinkináza; cAMP cyklický AMP; CREB „cAMP-response element-binding protein“; HIF-1 hypoxický indukibilní faktor; NF- κ B „nuclear factor“ κ B; NT nukleosidový transportér; PKA proteinkináza A; PKC proteinkináza C; PLC phospholipáza C.

Chemoterapie nukleosidovými analogy je stále důležitější terapií mnoha hematologických a solidních malignancí či virových onemocnění. Většina těchto léčiv je rozpoznávána nukleosidovými transportéry určujícími farmakologické vlastnosti léčiv ovlivněním jejich biodostupnosti a následné odpovědi na léčbu.^[72,73] Terapeutická nukleosidová analoga napodobují přirozené nukleosidy tak, že podléhají stejným procesům vychytávání a metabolismu a jsou začleněny do nově syntetizované DNA/RNA, čímž dochází k ukončení syntézy a apoptóze. Nicméně pro správné působení je zapotřebí funkčních NTs, která mohou být v opačném případě zodpovědná za toxicitu nebo rezistenci vůči léčivu.^[74,75]

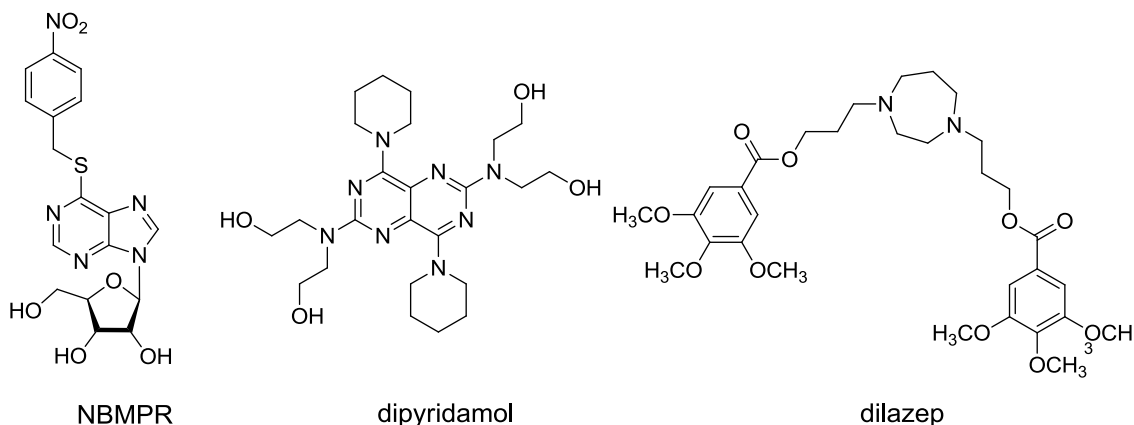
3.2.1 Nukleosidový transport

Nukleosidové transportéry jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: ekvilibrativní NTs (ENTs) a koncentrativní (CNTs). Byly identifikovány na základě molekulárního klonování a exprese cDNA kódujících nukleosidové transportéry mnoha živočišných druhů (savci, prvoci či bakterie).^[76-78]

Jsou známy čtyři lidské („human“, h) ENT podtypy: hENT1, hENT2, hENT3 a hENT4 a tři CNT podtypy: hCNT1, hCNT2 a hCNT3.^[79-85] Specifický transportní inhibitor nitrobenzylmerkaptopurin ribonukleosid (NBMPR) je schopen rozlišit hENT1, zprostředkovávající ekvilibrativní NBMPR-senzitivní (es) transportní aktivitu od hENT2, který zprostředkovává ekvilibrativní NBMPR-insenzitivní (ei) transportní aktivitu.^[79,80,86] Vazodilatační léčiva jako dilazep a dipyridamol jsou nenukleosidové inhibitory hENT1 i hENT2, ačkoliv hENT1 je až třikrát citlivější než hENT2.^[87,88] Oba tyto přenašeče vyskytující se převážně na plazmatických membránách akceptují jak purinové, tak pyrimidinové nukleosidy a hENT2 přenáší i některé nukleobáze, např. hypoxanthin^[89]. Široce selektivní hENT3 je zřejmě přenašečem intracelulárních membrán^[81,90,91], zatímco hENT4 přenáší adenosin a monoaminové neurotransmitery přes plazmatickou membránu v mozkové a srdeční tkáni. hENT3 ani hENT4 nejsou

citlivé vůči NBMPR, dilazepu ani dipyridamolu.^[82,90,92] hENT přenašeče usnadňují oboustrannou difuzi nukleosidů membránou na základě koncentračního gradientu a hENT3 a 4 vykazují zvýšenou aktivitu v kyselém pH, což by mohlo souviset s protony spřaženým mechanismem.^[81,93]

Obrázek 4: Struktury některých inhibitorů nukleosidových přenašečů



hCNTs přenášejí nukleosidy na rozdíl od hENTs proti koncentračnímu gradientu spojením vnitřního transportu nukleosidů s vnitřně směřovanými elektrochemickými Na^+ gradienty; hCNT3 je schopen transportu s protony spřaženým mechanismem.^[93] Všechny hCNTs jsou schopny transportovat uridin, ale ostatní nukleosidy přenáší s rozdílnou selektivitou; hCNT1 preferuje pyrimidinové nukleosidy a adenosin, hCNT2 zase purinové nukleosidy a uridin^[82,83,94,95] a hCNT3 je schopen transportovat purinové i pyrimidinové nukleosidy^[85]. Pro hCNTs není znám žádný selektivní inhibitor jako je tomu u hENTs, ale jejich funkčnost může být inhibována ligandy adenosinových receptorů^[96].

Ačkoliv jsou hCNTs spíše přenašeči plazmatické membrány, hCNT3 byl pozorován také v intracelulárních kompartmentech prolymfocytických buněk pacientů s lymfocytární leukemií^[97] a rovněž u hENTs, převážně membránových transportérů, je znám výskyt i intracelulární. Spoluúčast hENTs a hCNTs v jaterních buňkách může být žádoucí pro přenos nově syntetizovaných nukleosidů do krve nebo také „záchranu“ nukleosidů (získaných z potravy či z degradace nukleových kyselin) např. při poškození jater.^[98,99]

ENTs a CNTs jsou strukturně nepříbuzné rodiny proteinů. Např. hENT3 je z 29% a hENT4 z 18% identický s hENT1^[82], naproti tomu hCNT2 a hCNT3 jsou identické

s hCNT1 z 72% a 48%, resp..^[85,100] Dá se očekávat, že strukturní rozdíly nukleosidových léčiv mají vliv na rozdílnou permeační selektivitu různých typů NTs. Také rozdíly ve výskytu a četnosti výskytu ve všech typech tkání hrají roli v odlišnostech distribuce léčiva v tkáních, což v konečném důsledku ovlivňuje farmakokinetiku a toxikologické vlastnosti. A ačkoliv většina protinádorových nukleosidových léčiv působí na společné intracelulární cíle, každé také zvlášť vykazuje specifické interakce vedoucí k rozdílům v aktivitě u mnoha malignancí.^[73]

Rozdílné subtypy NTs poskytují rozdílnou selektivitu propustnosti nukleosidových protinádorových a antivirotických léčiv. Gemcitabin^[101], cytarabin^[102], 4'-thio-(β)-D-arabinofuranosyl cytosin^[103], cladribin^[104], fludarabin^[105] a 5'-deoxy-5-fluorouridin (metabolit capecitabinu)^[106] jsou transportovány hENT1. hENT2 a rENT2 („rat“, r) vykazují vyšší účinnost transportu antivirotických 3'-deoxy-nukleosidů jako je zidovudin (AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidin), zalcitabin (ddC, 2',3'-dideoxycytidin) a didanosin (ddI, 2',3'-dideoxyinosin).^[107] hENT2 přenáší gemcitabin^[108], cladribin a clofarabin^[104]. hCNT1 se účastní transportu gemcitabinu s vysokou afinitou^[101,109] a transportu cytarabinu, lamivudinu a 5'-deoxy-5-fluorouridinu s nižší afinitou^[110,111]. Ačkoliv didanosin a cladribin vykazují dobrou průchodnost přes rCNT2, přes hCNT2, jenž transportuje fludarabin a clofarabin, je jejich transport omezen^[104,112-114]. hCNT3 disponuje širším rozsahem selektivit vůči nukleosidovým analogům než hCNT1 či hCNT2 a je schopen transportu jak pyrimidinových (5-fluorouridin, 5'-deoxy-5-fluorouridin, gemcitabin, zebularin), tak purinových (fludarabin, cladribin, clofarabin) nukleosidových léčiv s vysokou účinností^[85,104].

Jakmile je léčivo transportováno do buňky pomocí ENTs nebo CNTs, je fosforylováno nukleosidkinázami (deoxycytidinkináza, deoxyguanosinkináza, thymidinkináza) a některá analoga mohou podléhat degradaci deaminací za katalýzy adenosindeamináz nebo cytidindeamináz. Některé cytoplazmatické 5'-nukleotidázy antagonizují nukleosidkinázy tím, že defosforylují monofosforylované nukleosidové deriváty, které jsou jinak dále fosforylovány 5'-nukleosidmonofosfátkinázami a 5'-nukleosiddifosfátkinázami. Začlenění aktivního derivátu ve formě trifosfátu s 3' modifikací do DNA a RNA může vést k buněčné smrti. Některá cytotoxická nukleosidová léčiva mohou vykazovat nepřímou cytotoxicitu inhibicí ribonukleotidreduktázy, což snižuje produkci 5'-deoxynukleosid difosfátů (dNDPs). Snižené množství přítomných dNDPs často zvyšuje začleňování derivátů ve formě 5'-deoxynukleosid trifosfátů do struktury DNA.^[115]

Nukleosidovými přenašeči zprostředkovaný buněčný transport je pro mnoho léčiv počátečním krokem k jejich působení. Vysoká rychlost proliferace nádorových buněk je spojena s vysokou hladinou es (např. hENT1) transportní aktivity^[75]. Výskyt hENT1 byl s využitím anti-hENT1 monoklonálních protilátek pozorován více u buněk nádoru prsu než u normálních buněk^[74] a snížená exprese hENT1 mRNA byla spojena s nižším rizikem recidivující akutní myeloidní leukémie u pacientů léčených cytarabinem^[102]. Teorie, že hENT1- zprostředkovaný nukleosidový transport je určující pro odpověď organismu na léčbu byla také potvrzena u pacientů s adenokarcinomem slinivky břišní, kde u těch pacientů, u kterých byla detekována vyšší hladina proteinu hENT1, byla popsána delší doba přežití než u pacientů s nízkou hladinou hENT1^[116]. Zavedení hCNT2 do NT-deficientní buněčné kultury akutní lymfoblastické leukémie (CEM) pomocí transferu genu obnovilo citlivost buněk vůči fluoropyrimidinovým nukleosidovým léčivům^[117]. Nicméně samotná role nukleosidových přenašečů (NTs) není dostatečně určující a je nutno brát v úvahu i další proteiny metabolizující nukleosidy, které spolupracují a dohromady určují citlivost rakovinné buňky na léčbu^[78].

3.2.2 Nukleosidová analoga k terapii proliferativních onemocnění

Nukleosidová analoga a nukleobáze jsou farmakologicky rozmanitá skupina cytotoxických sloučenin, antivirotických látek a imunosupresivních molekul.^[118]

Cytotoxická nukleosidová analoga jsou antimetabolity, jež interferují se syntézou nukleových kyselin a začleněním do struktury či změnou DNA a RNA, interakcemi s enzymy zapojenými do syntézy nukleových kyselin nebo modifikací metabolismu fyziologických nukleosidů vykazují svou toxicitu v buňce.^[119]

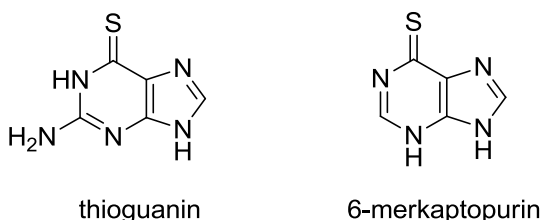
3.2.3. Analoga purinových nukleosidů

3.2.3.1 Thiopuriny

Merkaptopurin a **thioguanin** jsou analoga hypoxanthinu a guaninu. Aby mohly být biologicky aktivní, je nutná jejich fosforylace hypoxanthin-guanin fosforibosyl-transferázou za vzniku thioinosinmonofosfátu a thioguanosinmonofosfátu. Ty jsou dále převedeny na trifosfáty, které mohou být začleněny v syntéze nukleových

kyselin^[120,121]. Katabolismus merkaptopurinu a thioguaninu vede ke vzniku kyseliny thiomocové a kyseliny močové za pomoci xanthinoxidázy. Hlavním důvodem cytotoxického účinku thiopurinů je inkorporace jejich trifosfátů do nukleových kyselin, které interferují s funkcí DNA-polymeráz, ligáz a endonukleáz. Paradoxně ale vyšší dávka vede ke snížení účinku, jelikož začlenění merkaptopurinu do struktury DNA může být sníženo, když je celková syntéza DNA inhibována nedostatkem purinů^[122]. Dále ale mohou působit také inhibici enzymů 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát, amidotransferáza, IMP dehydrogenáza nebo ribonukleotidreduktáza, které jsou zapojeny do *de novo* syntézy purinů. Thiopuriny jsou důležitá léčiva akutních leukémií. Denní dávka při léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie je okolo 75 mg/m² merkaptopurinu^[123], nebo 50 mg/m² thioguaninu^[124]. K léčbě akutní myeloidní leukémie se využívá thioguanin v kombinaci s daunorubicinem a cytarabinem (DAT)^[125]. Nejběžnějším toxickým efektem thiopurinových léčiv je deprese kostní dřeně a allopurinol se někdy přidává k léčbě merkaptopurinem k prevenci hyperurikémie a urikosurie, které následují po uhynutí leukemických buněk.^[119]

Obrázek 5: Struktury thiopurinových derivátů



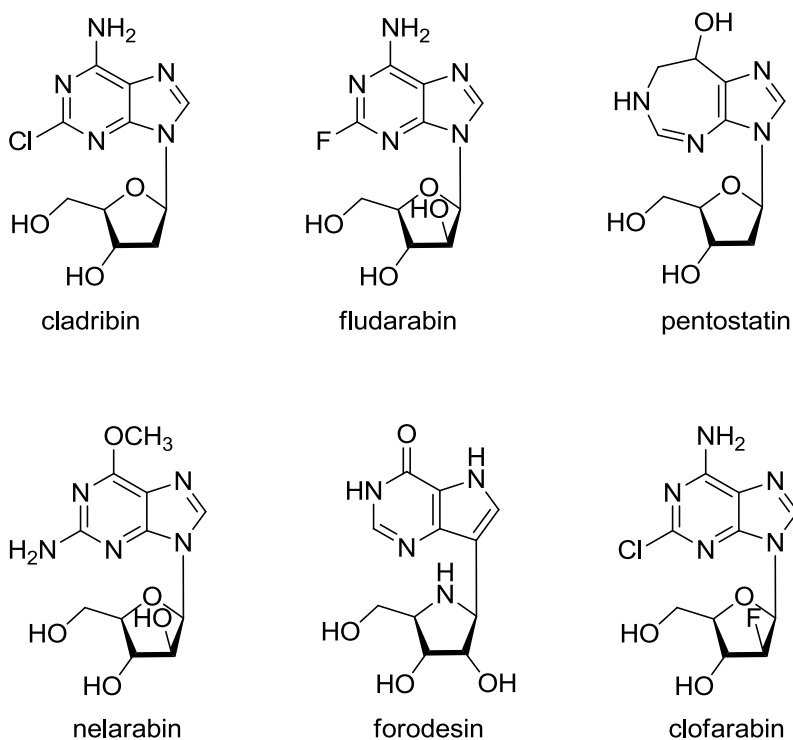
3.2.3.2 Starší a novější purinová analoga

Mezi starší PNAs se řadí **fludarabin** (2-fluoro-9-(β -D-arabinofuranosyl)adenin; FA), **cladribin** (2-chloro-9-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)adenin; 2-chloro-2'-deoxyadenosine; 2-CdA), a **pentostatin** (2'-deoxycoformycin; (8*R*)-3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,4,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3]diazepin-8-ol; DCF). Tato analoga, podobná vzájemně svou chemickou strukturou, jsou transportována do cílové buňky pomocí nukleosidových transportérů, fosforylována deoxycitidin kinázou (dCK) a defosforylována 5'-nukleosidázou (5'-NT).^[126,127] Hlavním výsledkem jejich působení je vyvolání apoptózy buňky a účinek je často posílen kombinací cytotoxických léčiv navzájem či s monoklonálními protilátkami.^[128,129] DCF s 2-CdA se využívají

k léčbě leukémie vlásenkových buněk (subtyp chronické lymfoidní leukémie)^[130], FA s 2-CdA k léčbě chronické lymfocytické leukémie a také non-Hodgkinových lymfomů (NHL) T- a B-lymfocytů^[131-134] a tato kombinace PNAs pomáhá také pacientům trpícím Waldenströmovou makroglobulinemií a kutánním lymfomem T-lymfocytů^[135-137].

Novějšími PNAs jsou **nelarabin** (6-methoxy-9-(β -D-arabinofuranosyl)guanin; pro ara-G), **forodesin** (7-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethylpyrrolidin-2-yl)-3,5-dihydropyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on; BCX-1777, immucillin H) a **clofarabin** (2-chloro-9-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-adenin; CAFdA).^[138] CAFdA vykazuje pozitivní účinky u akutní myeloblastické leukémie (AML), akutní lymfoblastické leukémie (ALL), chronické myelogenní leukémie ve fázi blastu (CML-BP) a myelodysplastického syndromu (MDS).^[139-141] Nelarabin je proléčivo 9- β -D-arabinofuranosylguaninu (ara-G)^[142-144], jenž je selektivně toxický vůči zralým T-lymfocytům a nezralým T-lymfoblastům. B-lymfoblasty nebo NK (natural killer) buňky jsou vůči ara-G rezistentní. Forodesin je inhibitorem purinnukleosidfosforylázy (PNP)^[145,146] a působí pozitivně při chronické lymfoblastické leukémii, NHL B-lymfocytů a T-lymfocytů.

Obrázek 6: Chemická struktura analog purinových nukleosidů



Fludarabin využívající se k léčbě CLL a dalších lymfoidních malignancí je v nepozměněné formě neaktivní kvůli nízké rozpustnosti. Proto komerčně dostupnou variantou je jeho „prodrug“ ve formě 5'-monofosfátu (FA-MP). Jakmile je dopraven do buňky, musí být převeden deoxyguanosinkinázou (dGK) nebo deoxycytidinkinázou (dCK) na 5'-trifosfát, biologicky aktivní formu fludarabinu.^[147] Cladribin, rezistentní vůči adenosindeamináze^[148,149], vyžaduje intracelulární fosforylaci k získání cytotoxické aktivity a jako fludarabin je také pomocí dCK převeden na 5'-trifosfát a v této formě je akumulován v buňce^[149]. Následně dochází k negativnímu ovlivnění průběhu celého buněčného cyklu poklesem syntézy DNA, buďto začleněním analoga do struktury DNA, inhibicí DNA-polymeráz, inhibicí schopnosti buňky opravit svou DNA nebo kumulací částí poškozených DNA řetězců. Cladribin také inhibuje aktivitu ribonukleotidreduktázy, což vede ke vzniku nerovnováhy v množství přítomných deoxynukleotid trifosfátů a aktivaci endonukleáz.^[150,151] Clofarabin kombinuje nejlepší farmakokinetické vlastnosti fludarabinu a cladribinu a zároveň je snížen potenciál toxicity závislé na dávce.^[152-154] Vykazuje zvýšenou rezistenci k deaminaci a fosforolýze než fludarabin a cladribin a i clofarabin je po dosažení intracelulárního prostoru buňky převeden pomocí dCK na 5'-trifosfát.^[155] Nelarabin (2-amino-9- β -D-arabinosyl-6-methoxy-9H-guanin, GW506U78) je desetkrát lépe rozpustným proléčivem 9- β -D-arabinofuranosyl-guaninu (ara-G) a v krvi dochází k demethylaci adenosindeaminázou za vzniku ara-G. Aktivním metabolitem v tomto případě není trifosfát, nicméně k fosforylaci dochází pomocí dCK nebo dGK za vzniku cytosolické či mitochondriální ara-GTP, resp.. Ara-G kompetuje s deoxynukleosidy jako substrát pro začlenění do struktury DNA DNA-polymerázami.^[156-159] V I. fázi klinického testování tento derivát vyvolal u 54% pacientů s malignancemi T-lymfocytů částečnou nebo úplnou remisi^[160] po jednom nebo dvou cyklech léčby. Byla pozorována také na dávce závislá neurotoxicita s malou klinickou myelosupresí.^[161] Forodesin, inhibitor purinnukleosidfosforylázy (PNP), je v nepřítomnosti PNP intracelulárně rovněž fosforylován za přítomnosti dCK či dGK na dGMP formu, a ta je poté pomocí mono- a difosfokináz převedena na aktivní dGTP formu.^[162] Purinnukleosidfosforyláza katalyzuje fosforolýzu purinových nukleosidů vedoucí ke vzniku příslušných bází a α -D-ribóza-1-fosfátů.^[163,164] Z popisu vzácných forem imunodeficiencí u dětí, jimž chybí tento enzym, vyplývá jeho důležitost pro celistvost imunitního systému. PNP-deficientní pacienti mají nízký počet T-lymfocytů, což vypovídá o důležitosti PNP při tvorbě těchto buněk.^[165-167] Nicméně inhibitory PNP mohou pomoci u onemocnění

způsobených nesprávnou funkcí T-lymfocytů, např. T-lymfocytární leukémie, psoriáza, revmatoidní artritida či při odmítavé reakci organismu u transplantací.^[168,169]

Adenosinová analoga **8-chloro-adenosin** a **8-amino-adenosin** redukují syntézu RNA a indukují buněčnou smrt snížením intracelulární koncentrace ATP^[170,171]. 8-amino-adenosin indukuje redukci syntézy RNA i DNA a 8-chloro-adenosin se nachází v I. fázi klinického testování u pacientů s CLL a zaměřuje se spíše na redukci syntézy RNA s preferencí mRNA^[173,174]. Ačkoliv tato snížená syntéza mRNA vede ke snížené expresi řady proteinů, cytotoxicita tohoto derivátu je připisována snížené expresi HGF/MET receptoru (u buněk myelomu) a cyklinu E (u buněk rakoviny prsu)^[175,176]. 8-chloro-adenosin trifosfát také inhibuje polymerizaci aktinu a aktivitu topoizomerázy II^[177,178].

3.2.4 Pyrimidinová nukleosidová analoga a nukleobáze

3.2.4.1 Deriváty deoxycytidinu

Cytarabin (1- β -D-arabinofuranosylcytosin, ara-C), analog deoxycytidinu, je používán k léčbě hematologických maligních onemocnění bez aktivity na nádory solidní. Je to jedno z nejaktivnějších léčiv akutní myeloidní leukémie. Běžné denní dávky 100-200 mg/m² vedly ke kompletní remisi (30% případů), při podání cytarabinu s anthracyklinem se procento zdvojnásobilo.^[119] Jakmile se toto léčivo dostane do buňky, rychlost limitujícím krokem intracelulárního anabolismu je konverze na arabinosyl CMP deoxycytidin kinázou^[179]. Cytarabin se degraduje na netoxický metabolit uracil arabinosid cytidin deaminázou a arabinosyl CMP může být defosforylován cytoplazmatickými 5'-nukleotidázami^[180]. Cytotoxicita cytarabinu je způsobena přímou inhibicí DNA-polymeráz a začleněním do DNA^[181]. Vedlejšími účinky cytarabinu jsou leukopenie (granulocytopenie), trombocytopenie, nevolnost a zvracení, ztráta vlasů, bolesti hlavy, dysartrie, letargie a další^[182].

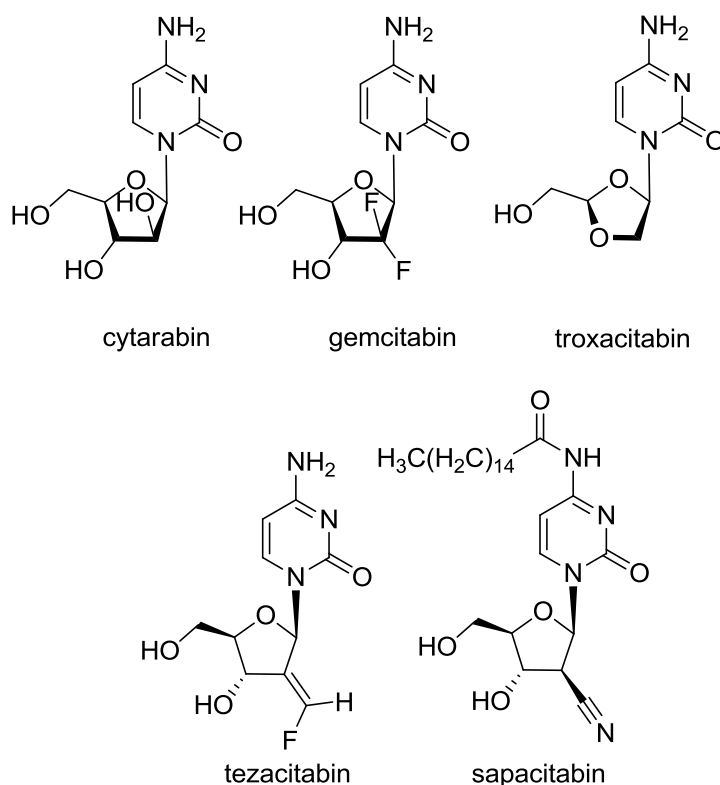
Gemcitabin (difluorodeoxycytidin, dFdC) působí na solidní nádory, vykazuje aktivitu vůči nádorům slinivky břišní, prsu, plic a vaječníků a jelikož je mnohem lipofilnější než cytarabin, je lepším substrátem nukleosidových membránových přenašečů a také má větší afinitu k deoxycytidin kináze. Tyto vlastnosti dodávají gemcitabin trifosfátu schopnost účinnější akumulace a delší retence v nádorové buňce, a tím také vyšší účinnost^[183]. Gemcitabin působí přímo začleněním do DNA/RNA i

nepřímo inhibicí ribonukleotid reduktázy^[184], tedy blokáci *de novo* syntézy DNA. Aktivita gemcitabinu se potencuje, jakmile dojde ke snížení koncentrace přirozených nukleosidů (hlavně dCTP), je zvýšená jeho inkorporace do DNA a také se zvýší tvorba gemcitabin difosfátu a trifosfátu. Nízká buněčná koncentrace dCTP také snižuje metabolickou clearance nukleotidů gemcitabinu deoxycytidin monofosfát deaminázou^[185,186]. Vysoká koncentrace gemcitabin trifosfátu přímo inhibuje dCMP deaminázu a CTP syntetázu^[187,188].

Troxacitabin (BCH-4556; (-)-2-(S)-hydroxymethyl-4-(s)-(cytosin-1'-yl)-1,3-dioxolan; β -L-dioxolan cytidin) je analog deoxycytidinu vykazující protinádorové aktivity jak u leukemií, tak u maligních epiteliálních onemocnění. Na rozdíl od ostatních nukleosidových analog transportovaných do cílové buňky nukleosidovými přenašeči vstupuje troxacitabin do intracelulárního prostoru především difuzí.^[189] Troxacitabin je rezistentní vůči deaminaci cytidin deaminázou a uvnitř buňky podléhá transformaci na trifosfát deoxycytidinkinázou, dále dojde k inkorporaci do struktury DNA a ukončení řetězce^[190]. Ve II. fázi klinického testování (2007) byl troxacitabin podáván 34 pacientům^[191] s lymfoproliferativním onemocněním nebo mnohočetnými myelomy intravenózně po dobu 4 týdnů. U všech pacientů byl pozorován nejméně jeden vedlejší účinek, vážnými vedlejšími účinky trpělo 62% pacientů. Došlo k třinácti úmrtím, ale ani jedno není připisováno přímo troxacitabinu. Stabilizace onemocnění byla u 44% pacientů, ovšem částečnou odpověď na léčbu měli pouze dva pacienti (13%), jsou proto nutné další studie a modifikace dávkování.

Tezacitabin (MDL-101731, KW-2331, FMdC, (E)-2'-deoxy-2'-(fluoromethylen)cytidin) je fosforylován na aktivní metabolity deoxycytidin kinázou a také podléhá deaminaci cytidin deaminázou. Po začlenění do struktury DNA zabraňuje tezacitabin trifosfát vazbě dalších nukleotidů DNA-polymerázou. Tezacitabin difosfát inhibuje ribonukleotid reduktázu, pro což byl původně navržen^[192,193] a má také antiangiogenní účinek, což bylo pozorováno u myších nádorových xenograftů^[194]. V I. fázi klinického testování (2002)^[195] byl podáván pacientům s refrakterními solidními nádory, výsledkem bylo obecně dobré přijetí léčby. Na dávce závislá myelotoxicita (především neutropenie) byla dominantním toxickým účinkem. Dávkování určené pro II. fázi klinického testování bylo 4 mg/m² denně po dobu pěti dní, intravenózně.

Obrázek 7: Chemická struktura analog pyridinových nukleosidů



CNDAC ((1-(2-kyano-2'-deoxy-(β)-D-arabino-pentofuranosyl) cytosin) byl původně syntetizován jako analog cytarabinu schopný, díky nukleofilnímu ataku kyano skupiny, indukovat zlomy řetězce DNA po své inkorporaci do DNA. CNDAC i jeho orálně dostupný derivát sapacitabin vykazují značnou aktivitu na lidské nádorové xenografty *in vivo*. Klinické testování fáze I a II samotného sapacitabinu či v kombinaci s jinými protinádorovými léčivy probíhalo u pacientů s CLL, AML, rakovinou plic a rozsáhlými solidními nádory^[196]. Stěžejní testy III. fáze byly započaty na starších pacientech s nově diagnostikovanou AML.^[197]

Na základě zjištění, že purinové i pyrimidinové cyklopentenylové deriváty vykazují biologickou aktivitu, byl připraven fluoro-cyklopentenyl-cytosin (RX-3117)^[198]. Tato látka disponuje cytotoxickou aktivitou *in vitro* i protinádorovou aktivitou *in vivo*. Jedná se o substrát nukleosidových přenašečů a před začleněním do struktury DNA/RNA je rovněž fosforylován cytidin kinázou a také inhibuje DNA methyltransferázu 1.^[199]

T-araC (OSI-7836, 4'-thioaracytidin, thiarabin) je na cukerné části modifikovaným nukleosidem s protinádorovou aktivitou zjištěnou ve fázi I klinického testování

(2006)^[200]. Jeho aktivita je připisována delší intracelulární retenci aktivního metabolitu v porovnání s cytarabinem.^[201,202]

3.2.4.2 Deriváty fluoropyrimidinu

Fluorouracil (nukleobáze) a floxuridin (nukleosid) mají účinky na rakovinu tlustého střeva, prsu, hlavy a krku. Aktivace fluorouracilu je podmíněna konverzí na floxuridin monofosfát, fluorouridin trifosfát či floxuridin trifosfát. Floxuridin monofosfát inhibuje přímo thymidylát syntázu, která katalyzuje redukční metylaci deoxyuridin monofosfátu na deoxythymidin monofosfát v přítomnosti kofaktoru 5,10-methylenetetrahydrofolátu. Deoxythymidin monofosfát je dále fosforylován a použit při syntéze DNA. Nicméně po vazbě floxuridin monofosfátu k thymidylátsyntáze je tento enzym blokován v ternárním kovalentním komplexu (thymidylátsyntáza, floxuridin monofosfát a folát) a dokud je tento komplex stabilní a thymidin nukleotidů je přítomných velmi málo, je inhibována syntéza DNA, dokud není připraven enzym nový. Inhibice thymidylát syntázy vede k rapidnímu snížení koncentrace deoxythymidin trifosfátu a expanzi dUMP, jenž je převeden na dUTP a ten také může být začleněn do DNA a následně „vyříznut“ uracil-DNA glykosidázou.^[203] Toto vede ke vzniku jedno- či dvouřetězcových DNA zlomů a apoptóze. Fluorouracil je také začleňován do RNA (více než do DNA) a ovlivňuje tak transkripci, intracelulární distribuci a translaci.^[204]

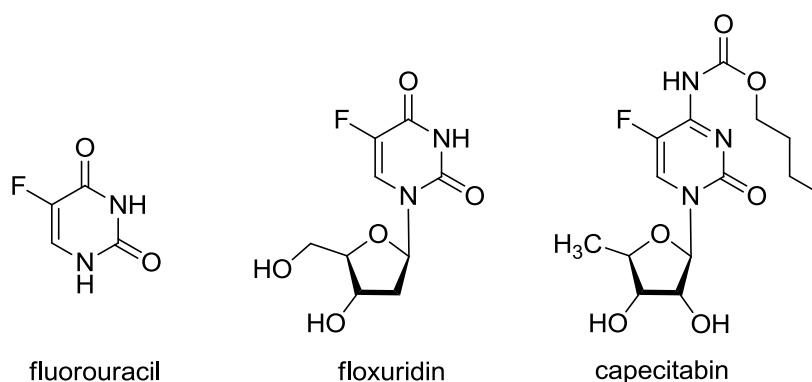
Ke zvýšení účinnosti fluorouracilu je možno jej podávat společně s kyselinou listovou, která sama o sobě toxická není, podporuje však cytotoxicitu fluorouracilu zvýšením tvorby ternárního komplexu. Byly však zjištěny zvýšené vážné gastrointestinální vedlejší účinky, je proto důležité dbát na správné dávkování^[205].

Mezi nové orálně dostupné fluoropyrimidinové nukleosidy patří např. **capecitabin**, který po požití prochází přes střevní sliznici a je rychle metabolizován na 5'-deoxy-5-fluorocytidin a 5'-deoxy-5-fluoruridin. Fluorouracil je generován následně za pomoci thymidin fosforylázy, jejíž přítomnost je známa u nádorových buněk ve větší míře, než u buněk zdravých^[206]. U metastatické rakoviny tlustého střeva působí capecitabin stejně dobře jako fluorouracil s kyselinou listovou, ale je méně toxický^[207]. Preklinická synergie kombinace capecitabinu a taxanů se zdá být způsobena upregulací intratumorální thymidin fosforylázy, indukovanou paclitaxelem a docetaxelem^[208] a

vykazovala pozitivní účinky ve fázi I klinického testování u pacientů s metastatizující rakovinou prsu (capecitabin + 175 mg/m² paclitaxel nebo 100 mg/m² docetaxel)^[209].

Fluorouracil je primárně katabolizován dihydropyrimidin dehydrogenázou na inaktivní 5-fluorodihydrouracil a inhibicí tohoto enzymu lze zvýšit aktivitu fluorouracilu jak ve zdravých tak nádorových buňkách. Bylo zjištěno, že exprese tohoto enzymu souvisí s rezistencí lidských nádorových myších xenograftů k fluorouracilu a fluoropyrimidinových nukleosidů^[210].

Obrázek 8: Struktury derivátů fluoropyrimidinu



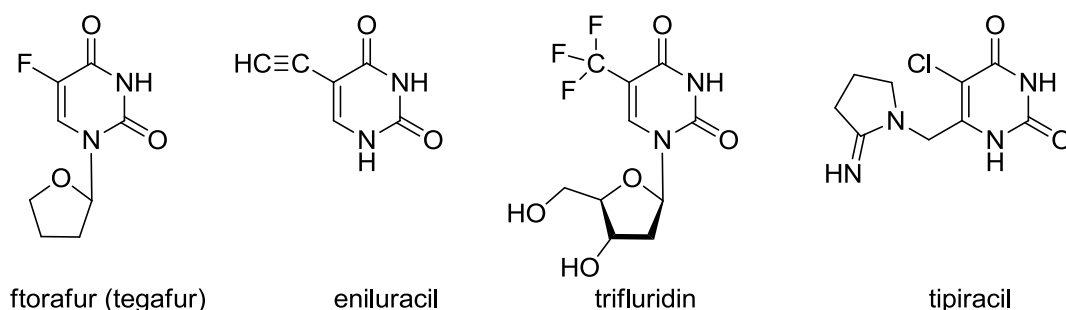
Eniluracil je ireversibilní inaktivátor dihydropyrimidin dehydrogenázy, který pozitivně ovlivňuje využití a biodostupnost fluorouracilu^[211]. Eliminace fluorouracilu z organismu se tak posouvá z metabolizace dihydropyrimidin dehydrogenázou na renální exkreci. U pacientů s metastatizující rakovinou tlustého střeva se tak účinnost orálně podávané kombinace fluorouracilu, eniluracilu a kyseliny listové (nebo bez ní) jeví stejná jako intravenózně podaná kombinace fluorouracilu a kyseliny listové^[212].

UFT je kombinace uracilu a ftorafuru (tegafur, proléčivo fluorouracilu) v molárním poměru 1:4. Ftorafur je transformován na fluorouracil díky jaternímu cytochromu P450 a uracil chrání fluorouracil před degradací kompetitivní inhibicí dihydropyrimidin dehydrogenázy. Dochází tedy ke zvýšení poločasu „života“ fluorouracilu a tím také ke zvýšení koncentrace a délky i účinnosti jeho působení.^[119] Koncentrace plazmatického fluorouracilu byla po orálním podání UFT obdobná jako po intravenózním podání ekvimolárního množství fluorouracilu v infuzi^[213]. UFT s kyselinou listovou dává obdobné výsledky protinádorové aktivity jako intravenózně aplikovaný fluorouracil s kyselinou listovou ovšem s méně vážnými vedlejšími účinky^[214].

S-1 je kombinace ftorafuru se dvěma modulátory fluorouracilu: 5-chloro-2,4-dihydroxypyridin a oxonát draselný (allantoxanát draselný či draselná sůl kyseliny 4,6-dihydroxy-1,3,5-triazin-2-karboxylové). 5-chloro-2,4-dihydroxypyridin je potenciálně lepším inhibitorem dihydropyrimidin dehydrogenázy než uracil a oxonát draselný je schopen selektivní inhibice fosforylace fluorouracilu v gastrointestinální sliznici, čímž je snížena vážnost průjmu, způsobeného ftorafurem. U potkaních xenograftových modelů byla tato kombinace selektivnější v porovnání s fluorouracilem^[215].

Trifluridin-tipiracil^[216] (TAS-102) je orálně biodostupná kombinace cytotoxického pyrimidinového analoga trifluridinu (5-trifluoro-2'-deoxythymidin, TFT) a inhibitoru thymidin fosforylázy (TPI) tipiracil hydrochloridu v molárním poměru 1:0,5 (TFT:TPI) s potenciální antineoplastickou aktivitou k léčbě metastatické rakoviny tlustého střeva (schválen FDA 2015). Po podání dochází k fosforylaci TFT na aktivní monofosfát TFT-MP, jenž se kovalentně váže do aktivního místa thymidylát syntázy, čímž redukuje koncentraci nukleotidů potřebných k syntéze DNA při replikaci. TFT ve formě trifosfátu může být začleněn do struktury DNA, indukuje DNA fragmentaci a inhibuje růst nádoru. TPI hraje roli při inhibici thymidin fosforylázy, která je důležitá v metabolismu nukleotidů a dalších procesů, včetně angiogeneze, a také napomáhá zvyšovat biodostupnost normálně krátkodobě přítomných antimetabolitů TFT ochranou jeho degradace na inaktivní formu trifluorothymin. Tento synergenní efekt TAS-102 může vysvětlovat cytotoxickou aktivitu na 5-fluorouracil rezistentních nádorových buněk.

Obrázek 9: Další struktury pyridinových analog



3.2.5 Strategie ke zlepšení účinnosti nukleosidových léčiv

Správné kombinace léčiv jsou klíčem k úspěšnější léčbě. U rakoviny plic (54% odpověď)^[217] a močového měchýře byla potvrzena účinnost kombinace gemcitabinu a cis-platiny, která je doporučovanou kombinací k léčbě pokročilých onemocnění a je bezpečnější formou než klasická M-VAC kombinace (methotrexát, vinblastin, doxorubicin a cis-platina)^[218]. Tolerabilita je zvýšena využitím záměny cis-platin carboplatinou v kombinaci s gemcitabinem^[219]. Také kombinace léčiv cílená na mikrotubuly, jako jsou taxany s gemcitabinem, ukazují slibné výsledky u pacientů s rakovinou prsu^[220]. K léčbě chronické lymfocytické leukémie je účinná kombinace fludarabinu a cyklofosfamidů^[221]. U FLAG režimu (kombinace fludarabinu, cytarabinu a G-CSF) vede kombinace fludarabinu a cytarabinu k větší míře inkorporace cytarabinu do struktury DNA^[222]. Kombinace nelarabinu a fludarabinu je také účinnou a lépe tolerovanou léčbou fludarabin-refrakterních indolentních chorob^[223].

Ke zlepšení účinku nukleosidového léčiva je také nutné zvýšit jeho koncentraci v buňkách pomocí aktivace či inaktivace enzymů podílejících se na jejich metabolizaci. Vystavení *in vitro* nádorových buněk etoposidu vede ke zvýšení deoxycytidin kinázy, což je enzym aktivující nukleosidová analoga. Také pacienti s AML jejichž blasty exprimují více cN-II 5'-nukleotidázu mají horší prognózy než pacienti s normální expresí tohoto enzymu, takže inhibice enzymu by mohla zlepšit léčbu cytarabinem^[180]. Také přidání hydrofobní skupiny k nukleosidovému léčivu za vzniku proléčiva štěpeného esterázami, které je schopno projít cytoplazmatickou membránou difuzí, je přístup ke zvýšení koncentrace v buňce^[224].

Samozřejmě také úplné pochopení mechanismu NTs je nutností pro zlepšení transportu nukleosidových léčiv do buněčného cíle.

3.3.6 Rezistence

Léková rezistence je redukce efektivity léčby onemocnění a důvodů a způsobů jejího vzniku je mnoho. Mezi hlavní mechanismy vzniku rezistence patří inaktivace či modifikace léčiva, změna cílového vazebného místa (např. u enzymů), změna metabolické dráhy, do které má léčivo zasahovat, případně snížená akumulace léčiva v buňce^[225].

Membránové transportéry

Pro úspěšnou léčbu je zapotřebí dostatečné množství funkčních nukleosidových přenašečů. Bylo provedeno mnoho studií s kulturami NT-deficientních buněčných linií, které vykazovaly vysokou rezistenci vůči léčbě nukleosidovými analogy^[101]. O výskytu hENT proteinů se hovoří jako o určujícím faktoru pro farmakologickou aktivitu či rezistenci léčiv, jelikož jejich výskyt se liší druhem nádoru, např. v různých typech non-Hodgkinových lymfomů a nádorech prsu lze nalézt rozdílné množství těchto proteinů a mohly by předpovědět, zda bude pacient k chemoterapii nukleosidovými léčivy rezistentní nebo nikoliv^[74,226] a jelikož hENT1 i hENT2 jsou obousměrné a na koncentraci závislé transportní proteiny, je dalším možným mechanismem rezistence eflux nukleosidových léčiv. Jakmile se nukleosidové léčivo dostane do intracelulárního prostoru, dalšími „překážkami“ jsou intracelulární NTs. Například mitochondriální hENT1 u buněčných kultur způsobil vyšší cytotoxicitu léčiva vůči mitochondriím^[119], ale naopak u pacientů s chronickou lymfocytickou leukémií s vyšší hladinou hCNT3 mRNA byla pozorována slabší odezva na léčbu fludarabinem, což vedlo k názoru, že rezistence k fludarabinu může být závislá na intracelulárním umístění hCNT3 proteinu^[97]. hENT3 protein, detekován v lysosomálních membránách, ukazuje možnost rezistence způsobenou akumulací a degradací nukleosidových léčiv v intracelulárních kompartmentech nádorových buněk^[81].

Deoxycytidin kináza (dCK)

Tento enzym je rychlost určující katalyzátor prvotní 5'-fosforylace deoxycytidinu na dCMP a mnoha nukleosidových analogů na jejich příslušné monofosfáty^[227-229]. Aktivita tohoto enzymu je vysoká i u klidových buněk, kde je potřeba opravovat poškozenou DNA. V případě, že se buňka nachází v S-fázi, je aktivita enzymu mnohonásobně vyšší.^[230-233] U různých buněčných linií rezistentních k nukleosidovým analogům byla prokázána aktivita dCK velmi malá až žádná^[234-237]. Transfekce dCK-deficientních nádorových linií genem dCK obnovilo *in vitro* senzitivitu vůči ara-C^[238,239]. Nejvyšší aktivita dCK byla pozorována v buňkách kostní dřeně a lymfoidních tkání, u nichž také aplikace nukleosidových analogů vedla k největším úspěchům^[240,241]. U dětských ALL^[242,243], AML^[244,245] a lymfoproliferativních onemocnění^[246] byla pozorována snížená exprese dCK genu nebo významné snížení aktivity enzymu, což je jeden z mechanismů vzniku rezistence k ara-C, fludarabinu a 2-CdA, ovšem někteří autoři

nenalezli žádný vztah mezi aktivitou dCK a klinickým působením nukleosidových analogů^[247,248].

Deoxyguanosin kináza (dGK)

Je to enzym zodpovědný za fosforylaci purinových deoxynukleosidů u savčích buněk, vykazující širokou substrátovou specifitu vůči přirozeným purinovým deoxynukleosidům stejně jako k nukleosidovým analogům, např. ara-G či 2-CdA^[250-252]. Převážně se vyskytuje v mitochondriích^[253], kde v matrix odpovídá za fosforylaci deoxynukleosidů a jejich analog a poskytuje tak dNTP pro syntézu DNA^[254-257]. Cytoplazmatická dGK zase dodává purinové deoxynukleotidy pro jadernou syntézu DNA při replikacích a opravě^[258]. Zda inaktivovaný enzym ovlivňuje rezistenci vůči nukleosidovým analogům, není zcela známo.

5'-nukleotidáza (5'-NU)

5'-NU defosforyluje nukleosid monofosfáty a cytotoxické mononukleotidy hydrolýzou esterové vazby mezi 5'-uhlíkem a fosfátovou skupinou. Funkce tohoto enzymu je opačná než dCK. Dvě skupiny těchto enzymů se podílejí na rezistenci buněk k nukleosidovým analogům: cytosolické a membránové 5'-NUs. Membránová, neboli „ecto-5'-NU“ je známá také jako CD73 a u akutních leukémií je hodně exprimována^[259,260]. Fyziologická funkce CD73 je převod extracelulárních nukleotidů na nukleosidy schopné průchodu buněčnou membránou transportními proteiny. Nicméně zatím nebyl identifikován žádný větší vliv tohoto enzymu na klinickou rezistenci pacientů k léčbě nukleosidovými analogy^[261].

Cytidin deamináza (CDD)

CDD katalyzuje inaktivaci cytidinu na uridin a deoxycytidinu na deoxyuridin a deaminuje také ara-C a gemcitabin^[262], což bylo doloženo také studiemi na myších fibroblastech a hematopoetických buňkách, do nichž byl transfgován lidský gen pro CDD a výsledkem byla léková rezistence vůči ara-C a gemcitabinu^[263-265]. V klinickém měřítku byla zjištěna spojitost mezi vyšší hladinou aktivity CDD a lékové rezistence u pacientů AML^[245,266-268], nicméně Tattersal *et al.* nenalezl žádný vztah mezi zvýšenou hladinou CDD a rezistencí v terapii AML pacientů^[244]. Strukturní analýzou byl korelován polymorfismus kodonu 27 genu CDD s rozdílnými stupni deminace ara-C *in vitro*^[269]. Nicméně tato strukturní aberace zřejmě nehraje hlavní roli v pozorovaných

rozdílech aktivit CDD u pacientů ara-C-senzitivních a ara-C-rezistentních. Byla ovšem pozorována významná korelace mezi množstvím CDD mRNA a aktivitou CDD enzymu u AML blastů, z čehož vyplývá, že rozdíly v aktivitě CDD vycházejí z rozdílné genové exprese spíše, než z aberací genu CDD^[268].

Koncentrace dCTP

Mnoho buněčných linií a AML blastů s vysokými hladinami dCTP prokazovalo ara-C rezistenci^[270-272]. dCTP inhibuje aktivitu dCK, což snižuje fosforylaci ara-C^[244], allostericky aktivuje enzym katabolismu CDD^[270] a kompetuje s ara-CTP při možnosti začlenit se do struktury DNA^[273,274]. Byla také zjištěna schopnost dCTP, v dostatečně vysoké koncentraci, obejít ara-C způsobenou DNA terminaci a pokračovat v elongaci řetězce i se začleněným ara-C^[275]. dFd-CTP také kompetuje s dCTP o začlenění do struktury nukleové kyseliny DNA-polymerázou^[276].

Ribonukleotid reduktáza

Ribonukleotid reduktáza je složená ze dvou neidentických proteinů R1 a R2. R1 obsahuje vazebná místa pro substrát a efektor a je přítomen během celého buněčného cyklu u proliferujících buněk. Protein R2 je dimer obsahující nehemové železo a volné tyrosylové radikály nutné pro reduktázovou aktivitu. Jeho exprese je specifická pro S-fázi buněčného cyklu a u klidových buněk není detekována R1 mRNA ani R2 mRNA.^[277] Například Goan *et al.* publikoval jako vysvětlení rezistence lidských KB nádorových buněčných linií na gemcitabin právě vysokou míru exprese R2 podjednotky^[278].

DNA-polymerázy

Inhibice DNA-polymerázy a obecně syntézy DNA je hlavním cílem působení většiny nukleosidových analog^[279,280], ovšem ne všechna působí stejnou měrou. DNA-polymeráza α se zdá být citlivější k ara-CTP než DNA-polymeráza β ^[281] a F-ara-ATP není potenciálním inhibitorem DNA-polymeráz β a γ či DNA-primáz^[282,283]. Nadměrná exprese DNA-polymeráz může být významným faktorem vedoucím k rezistenci^[284]. Také bylo popsáno, že citlivost DNA-polymerázy α k ara-CTP a F-ara-ATP byla nižší u blastocytů ALL pacientů než u buněk získaných od AML pacientů, z čehož byl vyvozen závěr, že DNA-polymeráza α u pacientů trpících ALL má nižší afinitu k léčbě nukleosidovými analogy^[285].

Defektivní mechanismy buněčné smrti a p53 exonukleázová aktivita

Poškození DNA způsobené nukleosidovými analogy indukuje expresi p53, což vede k indukci proapoptotických molekul a redukci antiapoptotických proteinů^[286-288]. Toto vede ke vzniku apoptózy^[289,290]. B-CLL a AML pacienti s mutacemi genu p53 vykazují rezistenci či slabší odezvu k fludarabinu, 2-CdA a ara-C^[291-294]. Jsou ale autoři, kteří u těchto onemocnění nepozorují žádný vliv abnormalit genu p53^[295,296]. Dalšími geny regulujícími apoptózu jsou Bcl-2, Bcl-X/L, Mcl-1 nebo Bag-1 a i tyto by mohly ovlivňovat citlivost léčby nukleosidovými analogy^[297-304]. Role proteinu p53 ve vzniku rezistence zahrnuje také jeho exonukleázovou aktivitu, kdy je schopen odstranit z řetězce DNA inkorporované nukleosidové léčivo. Také existuje informace, že ačkoliv 3'-5' exonukleázová aktivita wild-type p53 (wt-p53) proteinu je schopná vázat a odstranit gemcitabinová rezidua z DNA *in vitro*, odstranění léčiva z buněčného prostoru je však pomalé a u rezistentních buněk s mutovaným p53 dokonce nedetekovatelné^[305,306].

3.3 Antivirotika

3.3.1 Viry

Viry jsou částice (viriony) složené z nukleové kyseliny (RNA či DNA) a kapsidy, což je glykoproteinový obal složený z opakujících se jednotek. Kapsidy mají symetrický tvar (ikosaedrální nebo helikální) a mohou nést ještě navíc lipidovou membránu, kterou získávají z buněčné membrány při uvolnění z buňky. Viry můžeme rozdělit na DNA viry (jednovláknové ssDNA/dvouvláknové dsDNA), RNA viry (jednovláknové ssRNA/dvouvláknové dsRNA) a retroviry (DNA i RNA viry využívající reverzní transkriptázu). Viry samostatně nemohou existovat, jsou závislé na svém hostiteli, který jim exprimuje všechny potřebné součásti ke správnému množení.^[307]

Dělení virů ohrožujících člověka:

DNA-viry obalené:

čeleď *Poxviridae*:

lineární dsDNA

- variola, vakcinie, pravé neštovice, kravské neštovice, neštovice u opic

- čeleď *Herpesviridae*: lineární dsDNA
- HSV-1, HSV-2, VZV (varicella-zoster virus), EBV (virus Epsteinova a Barrova), CMV (cytomegalovirus), HHV-6 (lidský herpesvirus 6), HHV-7, HHV-8
- čeleď *Hepadnaviridae*: kruhová dsDNA
- HBV (virus hepatitidy typu B)

DNA-viry neobalené:

- čeleď *Adenoviridae*: lineární dsDNA
- lidské adenoviry
- čeleď *Papovaviridae*: kruhová dsDNA
- lidské papillomaviry, polyomaviry, JC virus („John Cunningham virus“), BK virus (způsob. např. nefropatii)
- čeleď *Parvoviridae*: lineární ssDNA
- parvovirus, virus B19

RNA-viry obalené:

- čeleď *Orthomyxoviridae*: (-)ssRNA
- viry chřipky A, B, C
- čeleď *Paramyxoviridae*: (-)ssRNA
- viry parainfluenzy, příušnice (virus epidemické parotitidy), virus spalniček, lidský respirační syncytiální virus (RSV)
- čeleď *Coronaviridae*: (+)ssRNA
- SARS („Severe Acute Respiratory Syndrome“)
 -
- čeleď *Filoviridae*: (-)ssRNA
- virus Ebola, virus Marburg
- čeleď *Arenaviridae*: (-)ssRNA
- virus Lassa, Junin virus (argentinská hemorragická horečka), Tacaribe virus
- čeleď *Rhabdoviridae*: (-)ssRNA
- virus vztekliny
- čeleď *Togaviridae*: (+)ssRNA
- alphaviry (encefalitida) a rubiviry (zarděnky)
- čeleď *Flaviviridae*: (+)ssRNA

- HCV (virus hepatitidy typu C), virus Zika (přenos egyptskými komáry, horečka, mikrocefalie plodu)
- čeleď *Retroviridae*: (+)ssRNA
- dělí se na tři podčeledi: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* a *Spumavirinae*
 - HTLV-1, HTLV-2, HIV („Human Immunodeficiency Virus“)

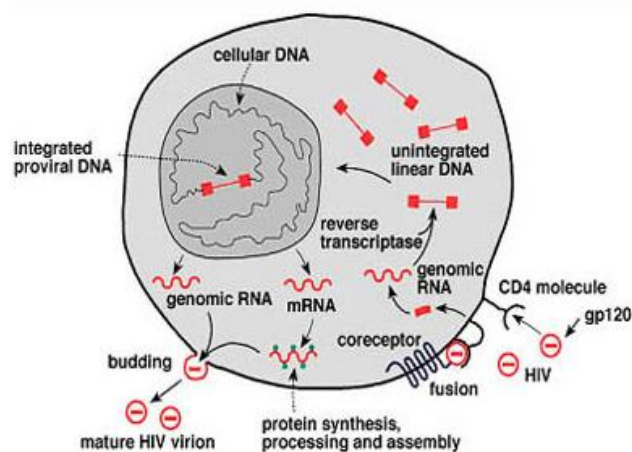
RNA-viry neobalené:

- čeleď *Picornaviridae*: (+)ssRNA
- enteroviry (polioviry, viry coxsackie A,B a echoviry (EV 68-71)) a rinoviry
 - HAV (virus hepatitidy typu A)
- čeleď *Reoviridae*: dsRNA
- rotaviry a orbiviry

Virus HIV

Virus HIV je virus, který způsobuje onemocnění AIDS, světově nejrozšířenější onemocnění poprvé popsané roku 1981. HIV ničí imunitní systém tím, že likviduje CD4⁺ T-lymfocyty, což vede k výraznému oslabení imunitního systému. Většina pacientů o své nemoci neví, protože trvá i několik let, než dojde k takovému oslabení počtu CD4⁺ T-lymfocytů, že si imunitní systém neporadí ani s dalšími onemocněními doprovázejícími AIDS jako jsou pneumonie, infekce intestinálního traktu, mozku, očí, ztráta hmotnosti, průjemy a také rakovina.^[308]

Obrázek 10: Replikační cyklus viru HIV^[308]



Pro léčbu HIV bylo k roku 2012 schváleno 26 léčiv zahrnujících NRTIs, NNRTIs, inhibitory proteázy, fúzní inhibitory, CCR5 koreceptorové inhibitory a inhibitory integrázy^[309].

3.3.2 Nukleosidová a nenukleosidová antivirotika s převážně anti-HIV aktivitou

1. Inhibitory S-adenosylhomocystein hydrolázy (SAH)

(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin (DHPA)

2. (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin (BVDU)

-inhibitor replikace viru varicella-zoster

3. 2',3'-dideoxynukleosidy (ddNs)

NRTIs (nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy) pro léčbu HIV

4. NNRTIs (nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy) pro léčbu HIV

5. Bicyklamy

6. Nukleosidové fosfonáty

a) Acyklické nukleosidfosfonáty

Cidofovir, adefovir, tenofovir – léčba infekcí DNA viry a retroviry

b) Cyklické nukleosidfosfonáty

3.3.2.1. Inhibitory S-adenosylhomocystein hydrolázy (SAH)

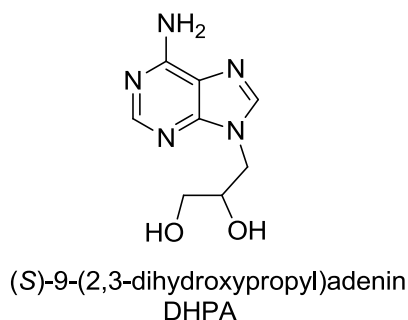
DHPA

DHPA je širokospektré antivirotikum působící proti řadě RNA i DNA virů^[310]. Aktivitu mu zapůjčuje specifická fosforylace pomocí herpes simplex virem kódované thymidin kinázy^[311,312].

Inhibitory SAH hydrolázy blokují štěpení S-adenosylhomocysteinu (SAH) na dvě části, homocystein a adenosin, který může být dále metabolizován na AMP, adenin či inosin. Důsledkem této inhibice se SAH kumuluje a jelikož SAH je zároveň produktem i inhibitorem reakce vedoucí z S-adenosylmethioninu (SAM) k SAH, je tato reakce utlačena. SAM je esenciální pro methylační procesy, např. capping virové mRNA, tudíž pokud jsou methylační reakce blokovány, nedochází k dozrávání virové mRNA a tedy i

ke vzniku pro vir potřebných proteinů. Inhibitory SAH mohou být účinné např. proti rhabdovirům, filovirům, arenavirům, reovirům, paramyxovirům, retrovirům, herpesvirům a poxvirům.^[313,314] Používá se k topickému ošetření oparů pod názvem Duvira gel®.

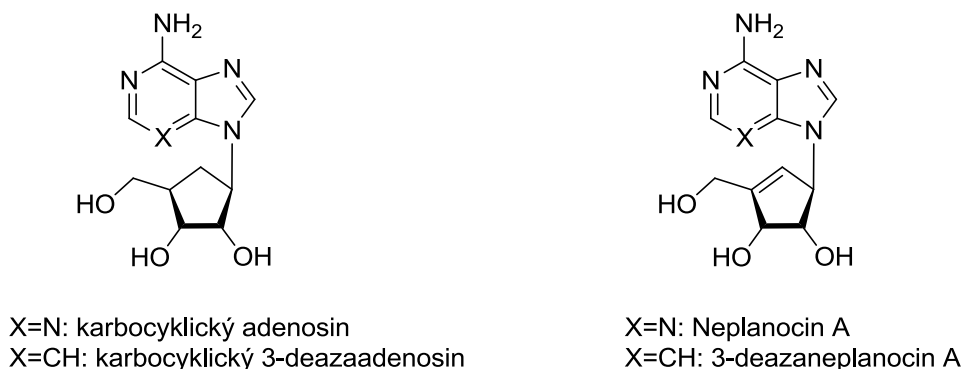
Obrázek 11: Struktura DHPA



3-dezaadenosin (C-c³Ado) a 3-deazaneplanocin A

U 3-dezaadenosinu byla nalezena schopnost plně ochránit BALB/c myši proti viru Ebola pomocí jediné injekce (80 mg/kg)^[315] a obdobné protektivní účinky byly pozorovány taktéž u 3-deazaneplanocinu A, kdy u Ebolou infikovaných myši docházelo k masivnímu vzrůstu množství interferonu, u neinfikovaných nikoliv. 3-deazaneplanocin A zřejmě, kromě inhibice methylačních reakcí, zabraňuje uvolnění molekul mRNA, čímž se tvoří komplexy těchto mRNA s (-)RNA teplátem, kumulují se dvouřetězcové RNA komplexy indukující interferon^[316].

Obrázek 12: Struktury karbocyklických analog adenosinu



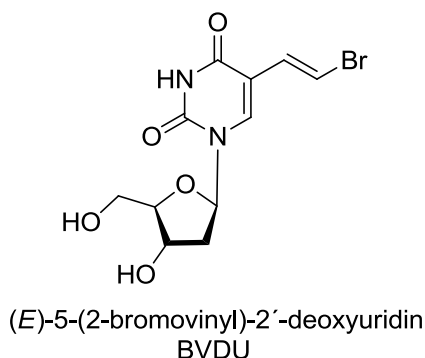
3.3.2.2. BVDU, (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin, brivudin

Jedná se o selektivní antivirové agens vůči viru HSV-1 (herpes simplex virus 1)^[317] a VZV (varicella-zoster virus)^[318]. Právě (E)-5-(2-bromovinyl) substituent v pozici C-5

uracilu určuje specifitu virové odpovědi. Mezi nejznámější deriváty BVDU patří **sorivudin** (BVaraU) s aktivitou vůči HSV-1 a VZV jako BVDU^[318]. Pro selektivitu je stěžejní specifická fosforylace BVDU na 5'-monofosfát (BVDU-MP) a 5'-difosfát (BVDU-DP) pomocí HSV-1 nebo VZV thymidin kinázy. BVDU-DP je dále fosforylována na 5'-trifosfát nukleosiddifosfát kinázou (NDPK, nebo jinou buněčnou kinázou) a BVDU-TP kompetuje s dTTP jako substrát pro DNA-polymerázu viru. Dojde k inhibici syntézy DNA viru nebo ke vzniku nefunkční molekuly DNA.^[318]

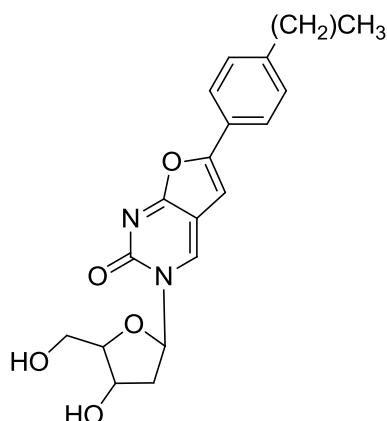
HSV-2 už není tak citlivý k BVDU, což se vysvětluje neschopností HSV-2 TK fosforylovat BVDU na 5'-mono- a difosfát. BVDU se nesmí podávat pacientům užívajícím 5-fluorouracil, jelikož BVDU je také snadno převedeno thymidin fosforylázou na volnou bázi BVU (*E*)-5-(2-bromovinyl)uracil, který inhibuje dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD), enzym zodpovědný za degradaci thyminu a uracilu. A tento enzym (DPD) degraduje i 5-fluorouracil, takže podání BVDU a 5-fluorouracilu zároveň může zvýšit toxicitu protinádorového léčiva^[319].

Obrázek 13: Chemická struktura BVDU



Dalšími látkami s anti-VZV aktivitou, nikoliv však anti-HSV, jsou bicyklická furo[2,3-*d*]pyrimidinnukleosidová analoga (BCNAs)^[320,321], mezi nimi Cf1742 a Cf1743^[322]. Tyto látky inhibují replikaci *in vitro* v subnanomolárních koncentracích (EC₅₀: 0,1–1 nM), což je desetkrát nižší koncentrace než u BVDU a desettisíckrát nižší než u acycloviru a pencicloviru, potřebná k inhibici VZV replikace^[322]. Musí být zřejmě rovněž fosforylovány VZV-TK a NDPK na formu 5'-trifosfátu. Jisté ale je, že nedochází ke vzniku volné báze a tedy není substrátem thymidin fosforylázy (TPáza). Pokud k tomu dojde, neinhibuje se DPD a neinterferuje s degradací 5-fluorouracilu^[323].

Obrázek 14: Chemická struktura bicyklických furo[2,3-*d*]pyrimidinnukleosidových analog



n = 4 Cf1743
n = 5 Cf1742

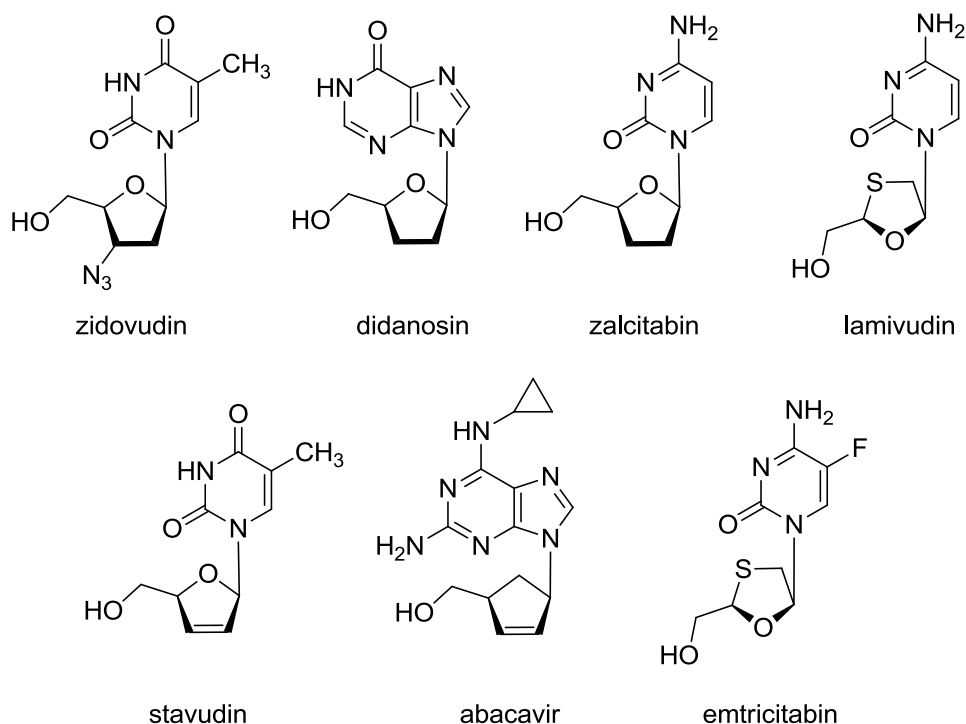
3.3.2.3. Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTIs)

Mezi 2',3'-dideoxynukleosidová léčiva působící inhibičně na reverzní transkriptázu k léčbě HIV infekcí patří schválená léčiva **zidovudin** (AZT, 3'-azido-2',3'-dideoxythymidin, Retrovir[®])^[324,325], **didanosin** (ddI, 2',3'-dideoxyinosin, Videx[®])^[326,327], **zalcitabin** (ddC, 2',3'-dideoxycytidin, Hivid[®])^[324,325], **stavudin** (d4T, 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidin, Zerit[®])^[326,327], **lamivudin** (3TC, 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin, (-) enantiomer Epivir[®]), **abacavir** (ABC, (1*S*,1*R*)-4-(2-amino-6-cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)-2-cyklopenten-1-methanolsulfát, Ziagen[®]) a **emtricitabin** ((-)FTC, (-)-β-L-3'-thia-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidin, Emtriva[®]).^[327]

Tabulka 3: Shrnutí používaných nukleosidových antivirotik

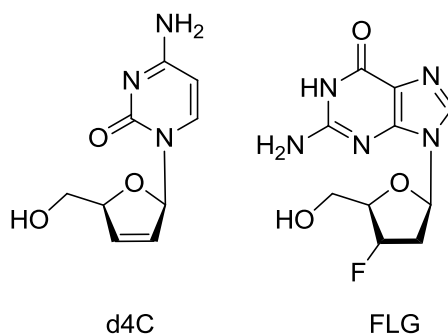
<i>Látka</i>	<i>Rok schválení/uvedení na trh</i>	<i>Komerční název</i>
Zidovudin	1987	Retrovir [®]
Didanosin	1991	Videx [®]
Zalcitabin	1992	Hivid [®]
Stavudin	1994	Zerit [®]
Lamivudin	1995	Epivir [®]
Abacavir	1998	Ziagen [®]
Emtricitabin	2003	Emtriva [®]

Obrázek 15: Chemická struktura používaných nukleosidových antivirotik



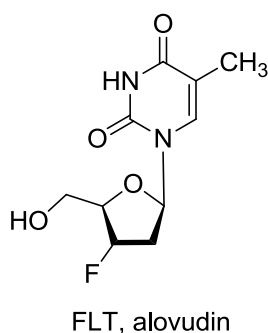
Na konci 80. let Balzarini a jiní autoři popsali další 2',3'-dideoxynukleosidová analoga jako **2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidin (d4C)**^[328], **3'-fluoro-2',3'-dideoxythymidin (FLT)** a **3'-fluoro-2',3'-dideoxyguanosin (FLG)**^[329,330].

Obrázek 16: Chemická struktura 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidinu a 3'-fluoro-2',3'-dideoxyguanosinu



U **alovudinu** (FLT, MIV-310, FddThd) byla v březnu 2015 ukončena II. fáze klinických zkoušek, antivirotická aktivita byla potvrzena, ovšem účinnost nedosáhla požadovaných cílů a také toxicita nepříznivě ovlivnila další vývoj^[331].

Obrázek 17: Chemická struktura alovudinu



U **β -D-Fd4C** (5-fluoroderivát d4C, Reverset[®]), cytosinového analoga podobajícího se 3TC (Epivir) a FTC (Emtriva), byla v roce 1998 porovnávána antivirotická a cytotoxická aktivita s β -L-Fd4C a 3TC (lamivudin) a ukázalo se, že **β -L-Fd4C** (elvucitabin, ACH-126443) je ze zmíněných tří nejúčinnější^[332]. V roce 2008 ukázala II. fáze klinického testování obdobnou účinnost a bezpečnost elvucitabinu jako tomu je u lamivudinu.^[333] Nyní je dále vyvíjen v Číně, Hong Kongu a Taiwanu^[334].

Lagociclovir valaktát (MIV-210, orálně dostupné proléčivo FLG): v roce 2013 byla přerušena I. fáze klinického testování^[335].

Racivir[®] (PSI-5004, racemická směs FTC) byl testován již ve II. fázi klinických zkoušek^[336].

Amdoxovir (DAPD, diaminopurin dioxolan): proléčivo, jenž je deaminováno adenosin deaminázou na DXG (9-(β -D-1,3-dioxolan-4-yl)guanin)^E. DXG je dále fosforylován na DXG-TP a dochází k inhibici HIV-1 RT začleněním do struktury DNA viru. DXG-TP také vykazuje účinky proti HBV u lidských hepatocytů^[337,338].

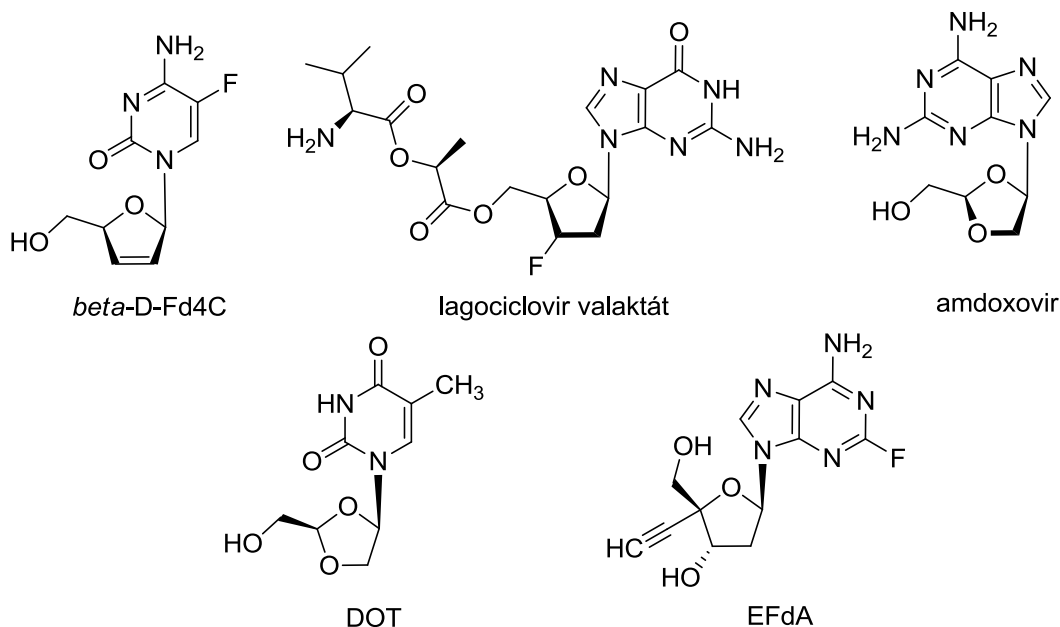
(-)- β -D-(2R,4R)-dioxolanthymine (DOT) je analog thymidinu aktivní *in vitro* proti NRTI-rezistentnímu wt-HIV-1. Nicméně anti-HIV aktivita DOT je limitována malou konverzí na monofosfát, což je první krok k aktivaci nukleosidového léčiva^[339,340]. Není to vhodný substrát nukleosid kinázy a takovýchto látek je více^[341], bohužel prvotní fosforylace je rychlost určujícím krokem. K odstranění tohoto problému jsou vyvíjeny fosforamidáty a také u DOT byla připravena řada jeho fosforamidátových analog^[342].

Mechanismus působení je pro všechna 2',3'-dideoxynukleosidová analoga (ddN) stejný jako u AZT^[343]. Dochází ke konverzi na příslušné 5'-mono-, di- a trifosfáty a aktivované léčivo (5'-trifosfát) kompetitivně inhibuje jako alternativní substrát cílový enzym, HIV-TK. Pokud dojde k začlenění léčiva do řetězce DNA (ve formě ddNMP),

elongace se okamžitě ukončí, jelikož není k dispozici 3'-OH skupina pro tvorbu esterové vazby s vedlejším nukleotidem.

4'-ethynyl-2'-fluoro-2'-deoxyadenosin (EFdA) má 3'-OH skupinu k dispozici a je proto účinnější k rezistentním a wt-HIV, HIV replikaci infikovaných jednojaderných periferních buněk krve inhibuje s účinností $EC_{50}=0,05$ nM a mechanismus jeho působení se liší. Reverzní transkriptáza může využít EFdA-TP jako substrát mnohem účinněji než přirozený substrát dATP, inkorporovaný monofosfát EFdA-MP působí jako terminátor RT-katalyzované syntézy DNA, protože dochází k potížím u translokace RT na primeru obsahujícímu 3'-terminální EFdA-MP (proto je EFdA-TP translokační-defektivním inhibitorem RT) a snížená translokace udržuje primerovou 3'-terminální EFdA-MP v ideálním místě pro fosforolytické vystřížení, nicméně pokud k němu dojde, EFdA-TP se okamžitě začlení znovu.^[344]

Obrázek 18: Struktury některých nových nukleosidových analog

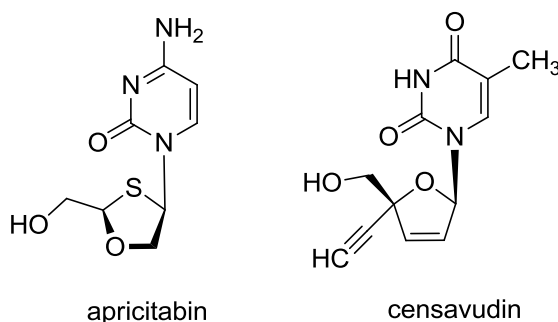


Některé nové anti-HIV nukleosidové deriváty

Apricitabin je deoxycytidinový analog druhé generace s potenciální anti-HIV aktivitou, zejména proti HIV-1 a klinickým izolátům s mutací reverzní transkriptázy (mutace M184V, L74V a mutace na kodonu 69).^[345,346] Vstup do fáze III. klinických zkoušek byl schválen v roce 2011^[347]

Festinavir^[348] je analog stavudinu s přidanou ethynylovou skupinou v poloze 4' ribózy, což snížilo hlavně mitochondriální toxicitu a zvýšilo účinnost a měl by být proto vhodný pro jednodenní dávkování^[349]. Nachází se ve II. fázi klinického testování. V roce 2013 byl přejmenován na **censavudin**, protože přípona „-navir“ je charakteristická pro inhibitory HIV-proteázy (např. tipranavir, lopinavir).

Obrázek 19: Chemická struktura apricitabinu a censavudinu



3.3.2.4. Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTIs)

Oproti nukleosidovým inhibitorům RT, které jako 5'-trifosfáty (ddNTPs) kompetují s přirozenými substráty (dNTPs) o vazebné místo HIV reverzní transkriptázy, interagují NNRTIs s allosterickým vazebným místem („kapsa“) umístěným cca 15 Å od katalytického místa. NNTIs tedy interagují nekompetitivně. Jen HIV-1 RT umožňuje vazbu NNRTIs v „kapse“ a proto tyto látky působí právě na HIV-1, nikoliv HIV-2.^[327]

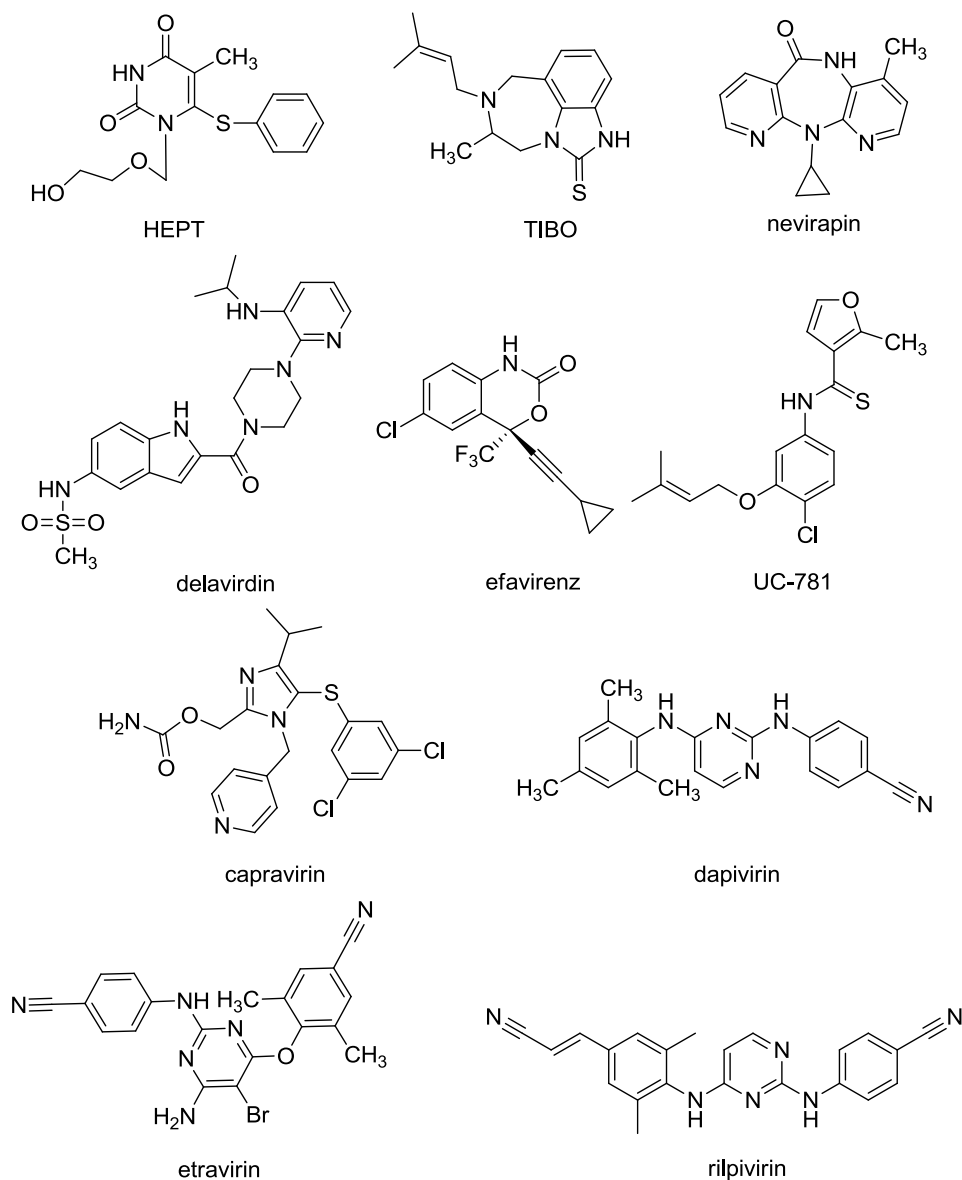
Mezi první NNRTIs patří **HEPT** (1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(fenylthio)-thymine)^[350] a **TIBO** (tetrahydroimidazo[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2(1*H*)-thion)^[351] a dále pak sloučeniny jako: **nevirapin** (11-cyklopropyl-4-methyl-5*H*-dipyrido[2,3-*e*:2',3'-*f*][1,4]diazepin-6-on, Viramune[®]), **delavirdin** (N-(2-(1-(3-(isopropylamino)pyridin-2-yl)piperazin-4-karbonyl)-1*H*-indol-5-yl)methansulfonamid, Rescriptor[®]), **efavirenz** ((4*S*)-6-chloro-4-(2-cyklopropylethynyl)-4-(trifluoromethyl)-1*H*-3,1-benzoxazin-2-on, Sustiva[®]), **capravirin** ([5-(3,5-dichlorofenyl)sulfanyl-4-propan-2-yl-1-(pyridin-4-ylmethyl)imidazol-2-yl]methylkarbamát, S-1153, AG1549), **thiokarboxanilid** (N-[4-chloro-3-(3-methylbut-2-enoxyl)fenyl]-2-methylfuran-3-karbothioamid, UC-781), **dapivirin** (4-[[4-(2,4,6-trimethylanilino)pyrimidin-2-yl]amino]benzonitril, TMC-120, R-147681), **etravirin** (4-[6-amino-5-bromo-2-(4-kyanoanilino)pyrimidin-4-yl]oxy-3,5-dimethylbenzonitril, TMC-125, R-165335, Intelence[®]) a **rilpivirin** (4-[[4-[(*E*)-2-

kyanoethenyl]-2,6-dimethylanilino]pyrimidin-2-yl]amino]benzonitril, Edurant[®], R-278474). Ačkoliv se všechny liší strukturou, mají společný rys a to je „butterfly“ typ konformace s centrální polární částí a dvěma laterálními hydrofobními křídly^[327] a díky rozpoznání této skutečnosti byly připraveny i další deriváty, např. emivirin^[351] [352,353]

Mezi NNRTIs druhé generace patří **rilpivirin** a **etravirin**, testování nukleosidového inhibitoru působícího jako NNRTIs emivirinu bylo bohužel ukončeno, jelikož způsoboval zvýšenou degradaci dalších léčiv metabolizovaných cytochromem P450^[354].

Inhibitory reverzní transkriptázy jsou velmi důležitými léčivy, ale bohužel nejsou schopny permanentně potlačovat chronickou replikaci viru a progresivní depleci CD4⁺ T-lymfocytů.

Obrázek 20: Struktury nenukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy



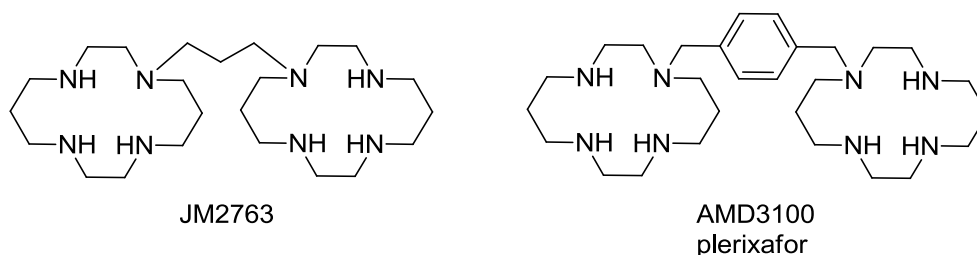
3.3.2.5. Bicyklamy

Tento typ látek odstartoval snahou připravit komplex cyklam-kov, který by působil inhibičně na replikaci HIV, podobně jako polyoxometalátové komplexy ($\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$, JM1493)^[355]. Bylo připraveno mnoho derivátů jak s alifatickými, tak s aromatickými můstky, mezi nimi JM2763^[356] a JM3100 (AMD3100)^[357]. AMD3100 (znám jako Plerixafor) vykazoval až stonásobně vyšší anti-HIV aktivitu s $\text{EC}_{50}=1\text{-}5\text{ nM}$ než JM2763.

Plerixafor působí jako mobilizátor kmenových buněk blokací CXCR4 chemokinového receptoru. Blokace CXCR4 spouští rapidní uvolnění kmenových buněk do krve, čehož se využívá zejména u pacientů s nádorovým onemocněním u transplantace kostní dřeně. První anti-HIV aktivita byla pozorována během I. fáze klinických zkoušek, kdy AMD3100 zvyšoval počet leukocytů po jediné intravenózní dávce, což bylo způsobeno již zmíněnou mobilizací hematopoetických buněk kostní dřeně do krevního oběhu^[358]. V prosinci 2008 byl schválen FDA pro použití ve formě subkutánní injekce spolu s granulocyty stimulujícím faktorem (G-CSF) k mobilizaci hematopoetických kmenových buněk do periferní krve pro kolekci a následnou autologní transplantaci u pacientů s NHL a mnohočetným myelomem^[359].

Bicyklamy jako antivirová léčiva působí jako selektivní inhibitory replikace HIV-1 i HIV-2. Blokuji první krok životního cyklu viru - adsorpci k CD4 receptoru a jeho reverzní transkripci.

Obrázek 21: Struktura některých bicyklamů s alifatickým a aromatickým přemostěním



3.3.2.6. Nukleosidové fosfonáty

Z důvodu mnohdy malé afinity nukleosidových analog k příslušným kinázám a tedy i kvůli malé konverzi na aktivní nukleosidtrifosfát byly připravovány již monofosforylované nukleotidy, nicméně ty jsou snadno hydrolyzovatelné přítomnými fosfatázami v buňce. Proto záměna fosfátové skupiny za isosterní a isoelektronovou fosfonátovou skupinu vedlo ke vzniku chemicky i enzymaticky stabilnějších nukleosid fosfonátů, které se svou $\text{CH}_2\text{-P}$ -vazbou nejsou substráty fosfodiesteráz a fosfatáz, nicméně dochází k enzymatické fosforylaci za vzniku aktivních metabolitů. Nukleosid fosfonáty můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: acyklické nukleosid fosfonáty (ANPs) a cyklické nukleosid fosfonáty (CNPs)^[360].

a) Acyklické nukleosidfosfonáty (ANPs)

Původ těchto sloučenin lze nalézt u DHPA ((S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin), z něhož byl pomocí kyseliny fosfonomravenčí (PFA, foscarnet) připraven první zástupce této skupiny antivirotik HPMPA ((S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)adenin) aktivní vůči DNA virům^[361], který ovšem nebyl prodáván ke klinickému účelu. Po HPMPA následoval **cidofovir** (HPMPC)^[362] vykazující také účinky proti cytomegaloviru a užívá se pod názvem Vistide® k léčbě CMV retinitidy (cytomegalovirový zánět sítnice) u pacientů s AIDS. Cidofovir je navíc účinný i proti polyomavirům, HPV, HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HHV-7, HHV-8 a poxvirům^[363,364].

Nejprve dochází k fosforylaci HPMPC buněčnými enzymy na HPMPCp a HPMPCpp, jenž je považován za aktivní metabolit^[365]. Ten pak kompetuje s dCTP o začlenění do struktury DNA a dochází k terminaci elongace. Podává se intravenózně, ale také topicky, např. u na acyclovir rezistentních mukokutánních infekcí HSV-1 a HSV-2.^[363]

Dalším zástupcem je **adefovir** (PMEA, 9-(2-fosfonomethoxyethyl)adenin)^[361], který byl ve formě bis(pivaloyloxymethyl)-derivátu (bis(POM)PMEA, **adefovir dipivoxil**) vyvinut jako anti-HIV kandidát, ale v dávce 120 mg/den byl (nefro)toxický. Po snížení dávky na 10 mg/den byla započata jeho úspěšná dráha léčiva proti chronické hepatitidě

typu B (Hepsera[®])^[363]. Adefovir je účinný proti virům jako jsou herpesviry (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV), hepadnaviry (HHBV) a retroviry (HIV-1, HIV-2).

Tak jako u HPMPC, je nutná dvojnásobná fosforylace za vzniku PMEApp. Toho může být dosaženo, kromě AMP kinázy a ATP, také pomocí PRPP (5-fosforibosyl-1-pyrofosfát)^[365]. Po odstranění difosfátové skupiny působí jako terminátor elongace u HIV-RT i HBV-RT, nicméně PMEa ve formě orálního proléčiva (adefovir dipivoxil) je užíván především k léčbě HBV infekce.

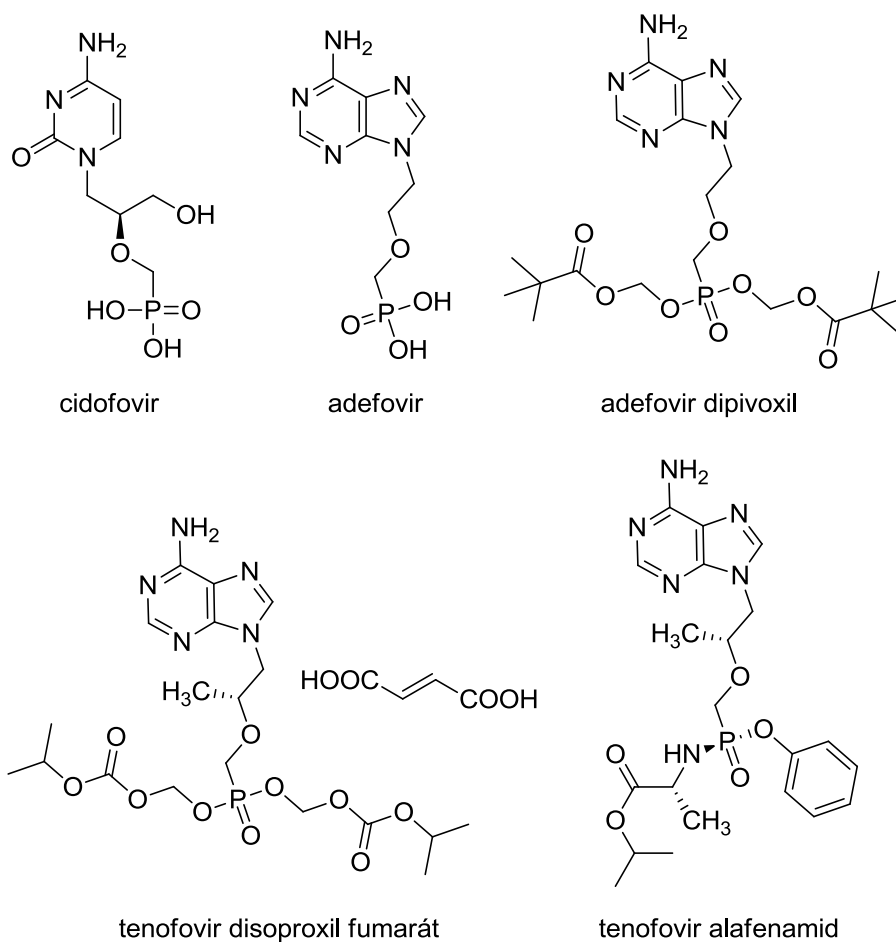
Anti-HIV vlastnosti **tenofoviru** ((R)-PMPA)^[366] byly poprvé pospány v roce 1993. Pro docílení orální dostupnosti je také prodáván ve formě proléčiva bis(isopropoxykarbonyloxymethyl)-derivátu (bis(POC)PMPA) jako **tenofovir disoproxil fumarát**^[365] (TDF) pod názvem Viread[®]. Tenofovir působí proti hepadnavirům a retrovirům a oproti adefoviru nevykazuje účinky vůči herpesvirům. TDF se využívá k léčbě AIDS a chronické hepatitidy typu B. K léčbě AIDS se rovněž využívá ve formě tablety/den kombinace Viread[®] 300 mg a Emtriva[®] ((-)-FTC) 200 mg pod komerčním názvem Truvada[®].

Tenofovir alafenamid (TAF, GS-7340, 9-[(R)-2-[(S)-1-(isopropoxykarbonyl)ethyl]amino]phenoxy-phosphinyl]methoxy]-propyl]adenin) byl popsán jako novým, převážně v lymfatické tkáni se kumulujícím, fenyl monofosforamidátovým proléčivem (R)-PMPA^[367-370]. Hlavním činitelem intracelulární hydrolýzy GS-7340 je lysosomální karboxypeptidáza kathepsin A^[371]. Po spontánní eliminaci fenolové skupiny je rozdělen alanin a tenofovir fosfoamidát (R)-PMPA (zřejmě fosfoamidázou) a (R)-PMPA je pak fosforylován na formy (R)-PMPAp a (R)-PMPApp (aktivní metabolit)^[372]. TAF je v porovnání s TDF účinněji dopraven do buněk lymfoidní tkáně, což umožňuje vyšší antivirotický potenciál za současného podávání nižších dávek léčiva^[373].

Tabulka 4: Shrnutí komerčně dostupných antivirotik

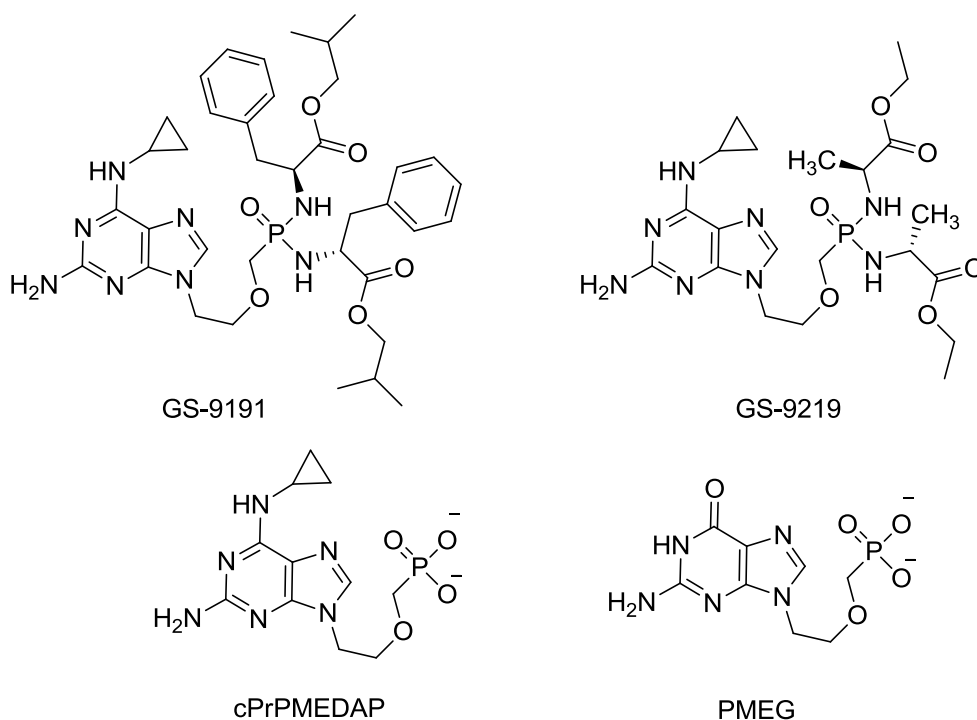
Látka/kombinace látek	Rok schválení/ uvedení na trh	Komerční název	Účinek
(S)-DHPA	1987	Duvira gel [®]	Herpes labialis (opary)
Cidofovir	1996	Vistide [®]	Systémová léčba HCMV retinitidy i pacientů s AIDS
Adefovir dipivoxil	2002	Hepsera [®]	Chronická hepatitida typu B
Tenofovir disoproxil fumarát (TDF)	2001	Viread [®]	HIV
Tenofovir disoproxil fumarát (TDF)	2008	Viread [®]	HBV
TDF + (-)FTC	2004	Truvada [®]	HIV
TDF + (-)FTC	červenec 2012	Truvada [®]	Prevence HIV/AIDS
Truvada [®] + efavirenz (Sustiva [®])	2006	Atripla [®]	HIV
Truvada [®] + rilpivirin (Edurant [®])	2011	Complera [®] / Eviplera [®]	HIV
TDF + (-)FTC + cobicistat (farmakoenhancer) + elvitegravir	srpen 2012	Stribild [®]	HIV

Obrázek 22: Chemické struktury acyklických nukleosidových fosfonátů



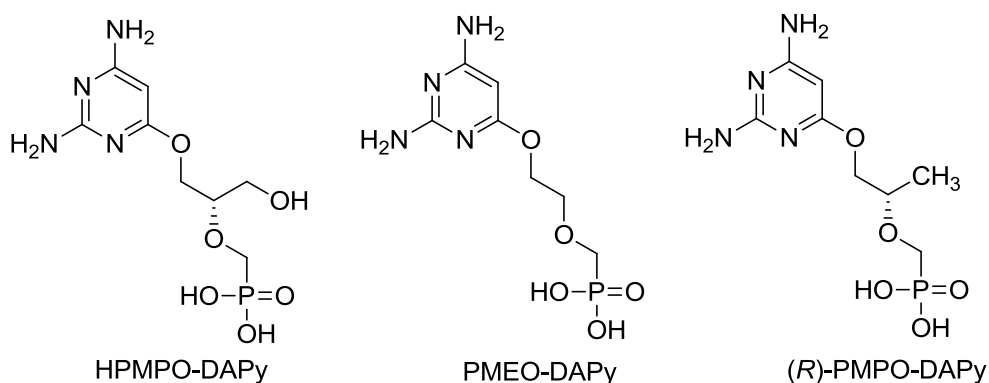
Látky **GS-9191** a **GS-9219** mohou být považovány jako proléčiva **cPrPMEDAP** (N^6 -cyklopropyl-9-(2-fosfonymethoxyethyl)-2,6-diaminopurin), který je zase proléčivem látky **PMEG** (9-(2-fosfonymethoxyethyl)guanin). PMEG byl nakonec ohodnocen jako příliš toxický pro další vývoj jako antivirotikum^[374], nicméně je v procesu vývoj jeho hexadecyloxypropylového proléčiva pro léčbu proliferativní vitreoretinopatie, jelikož PMEG vykazoval inhibiční aktivitu vůči proliferujícím RPE („retinal pigment epithelial“) buňkám^[375]. Aktivním metabolitem PMEG je PMEGpp, jenž kompetuje s přirozeným dGTP o DNA-polymerázami zprostředkované začlenění do struktury DNA. Protinádorová aktivita cPrPMEDAP byla poprvé popsána na potkaních modelech^[376] a enzymem zodpovědným za konverzi cPrPMEDAP na aktivní metabolit je dlouhou dobu neznámá N^6 -methyl-AMP aminohydroláza^[377]. U látky GS-9191 byla zjištěna možnost topické aplikace na genitální bradavice způsobené HPV virem^[378] a látka GS-9219 zase vykazuje účinnost proti NHL u psů po intravenózním podání^[379]. GS-9219 také inhibuje opravu DNA u chronické lymfocytické leukémie (CLL) a tím aktivuje signální dráhy vedoucí k buněčné smrti^[380].

Obrázek 23: Chemická struktura PMEG a jeho orálně dostupných profarmak



O-DAPy fosfonátová analoga jsou **6-((2-fosfonylmethoxy)alkoxy)-2,4-diaminopyrimidiny**: (*R*)-HPMPO-DAPy, PMEO-DAPy a (*R*)-PMPO-DAPy^[381-383]. (*R*)-HPMPO-DAPy je aktivní obdobně jako cidofovir ((*S*)-HPMPC) na herpesviry, polyomaviry, papillomaviry, adenoviry či poxviry, zatímco pole působení PMEO-DAPy, 5-X-PMEO-DAPy a (*R*)-PMPO-DAPy je obdobné aktivitě PMEa (adefoviru) a (*R*)-PMPA (tenofoviru), tedy hlavně vůči virům HIV a HBV.^[384-386] 5-methyl-PMEO-DAPy je také kandidátem s anti-HIV účinky dokonce lepšími než adefovir s menší toxicitou^[384] a (*R*)-PMPO-DAPy se zase vyznačuje spíše aktivitou vůči pixvirům^[387]. O-DAPy fosfonátová analoga působí na syntézu virové DNA jako mimetika purinových nukleotidů, dochází k fosforylaci na (O-DAPy)p a (O-DAPy)pp a difosfát následně kompetuje s dATP o začlenění do struktury DNA^[388].

Obrázek 24: Chemická struktura 6-((2-fosfonylmethoxy)alkoxy)-2,4-diaminopyrimidinů



Mezi sledovaná 5-azaC fosfonátová analoga obsahující triazinový 5-azacytosin místo pyrimidinového cytosinu patří např. (*S*)-HPMP-5-azaC, cyklický (*S*)-HPMP-5-azaC a také proléčivo ve formě hexadecyloxyethylového (HDE) derivátu^[389,390]. Analoga (*S*)-HPMP-5-azaC vykazují obdobnou antivirotickou aktivitu jako (*S*)-HPMPC^[391] a HDE proléčivo (*S*)-HPMP-5-azaC vykazuje značnou aktivitu vůči polyomavirům^[392] a orthopoxvirům příbuzným těm, kteří způsobují pravé neštovice (variola).^[393] 5-azaC fosfonátová analoga podléhají rovněž fosforylaci za vzniku (5-azaC)p a (5-azaC)pp a následuje kompetice s dCTP o místo ve struktuře DNA viru^[388].

Chemical structures of the compounds are shown:

- (S)-HPMP-5-azaC
- cyclický (S)-HPMP-5-azaC
- HDE-HPMP-5-azaC

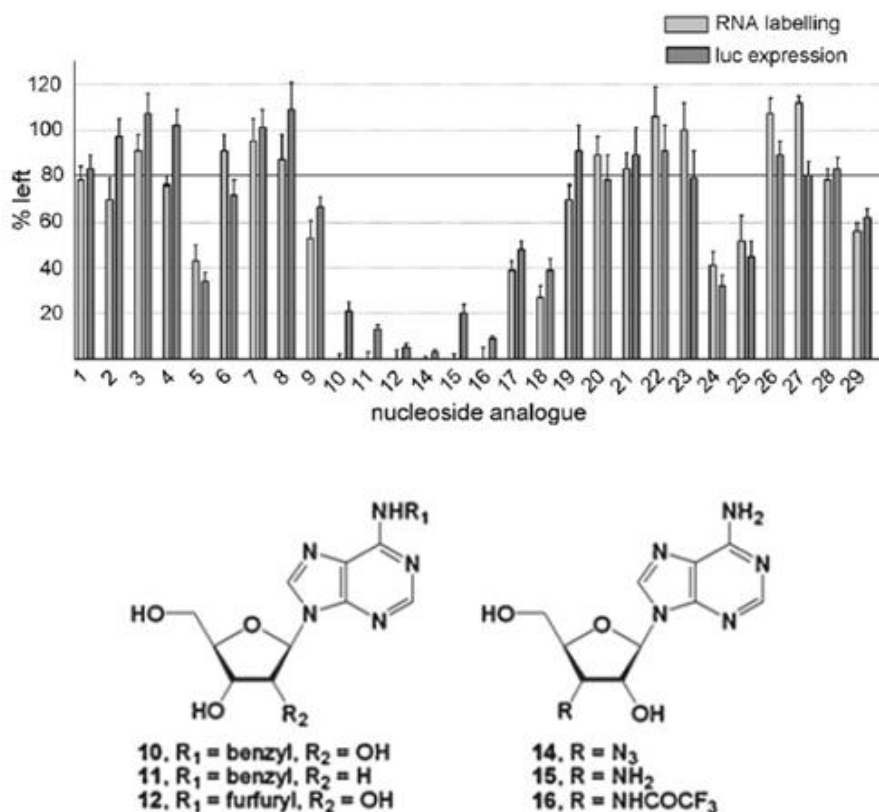
Tyto deriváty se dají považovat za pravá nukleosidová analoga obsahující bázi i cukernou část. Není jich mnoho v porovnání s ANPs a ztráta jejich antivirové aktivity se obecně vysvětluje tím, že nejsou příliš vhodnými substráty pro buněčné a virové kinázy. Ve snaze obejít jejich nedostatky byly navrženy látky s fosfonoalkoxy-skupinou v poloze 3'. Příkladem jsou (*L*)-2-deoxythreosyl nukleosidfosfonáty PMDTA^[394] a PMDTT^[395], jakožto selektivní anti-HIV látky^[396].

Chemical structures of PMDTA and PMDTT are shown. PMDTA (left) is a bicyclic phosphonate with a 2-aminopurine-9-yl group. PMDTT (right) is a bicyclic phosphonate with a 2-methyl-4,6-dioxypyrimidin-5-yl group.

3.3.3 N^6 -benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurin

Na začátku této práce, v části zabývající se cytokininy, byla popsána cytokininová aktivita benzylaminopurinu a cytotoxická aktivita jeho ribosidu. 2'-deoxyribosid této purinové báze je ovšem znám pro své antivirotické vlastnosti. V roce 2008 Pohjala^[397] *et al.* uvedli výsledky testování antivirotických vlastností 29 nukleosidů na replikaci Semliki Forest viru (SFV) a Sindbis viru, patřících do čeledi alfavirů. Mezi těmito nukleosidy byl také N^6 -benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurin (v grafu na obr. č. 27 pod číslem 11).

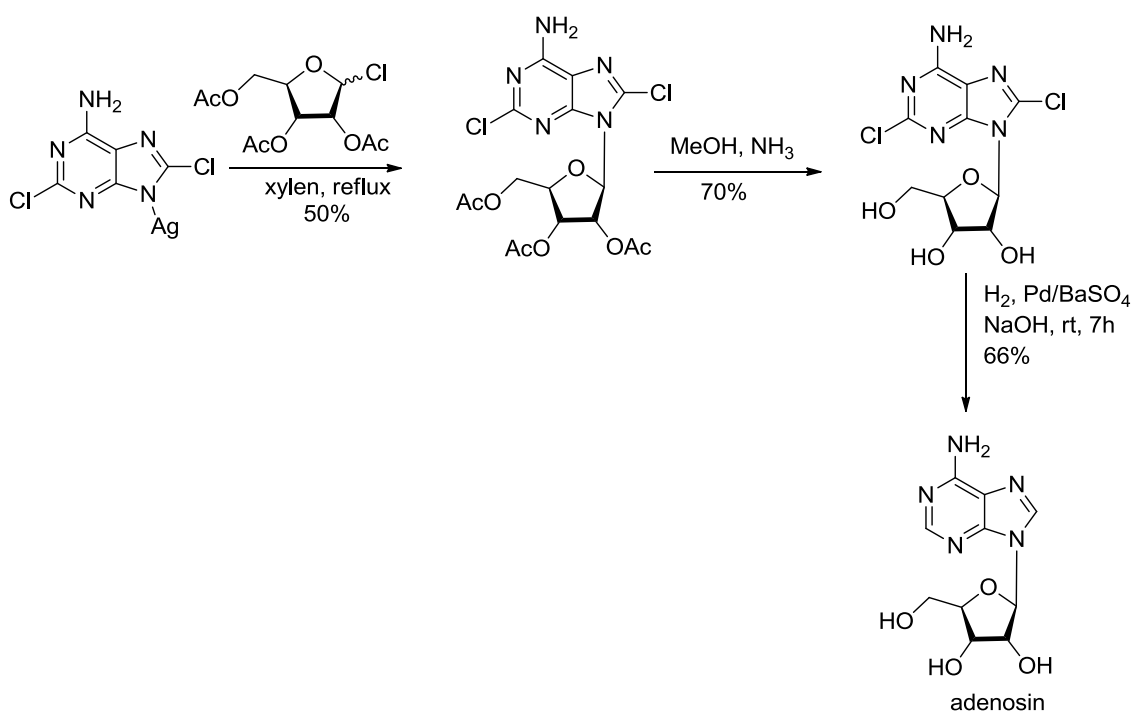
Obrázek 27: Grafické znázornění výsledku primárního screeningu pomocí dvou různých metod (viz.^[397]) po dobu 14 h při koncentraci 200 μ mol a struktury nukleosidových analogů s nejvyššími antivirotickými účinky.



3.4 Základní principy syntézy ribosidů a 2'-deoxyribosidů

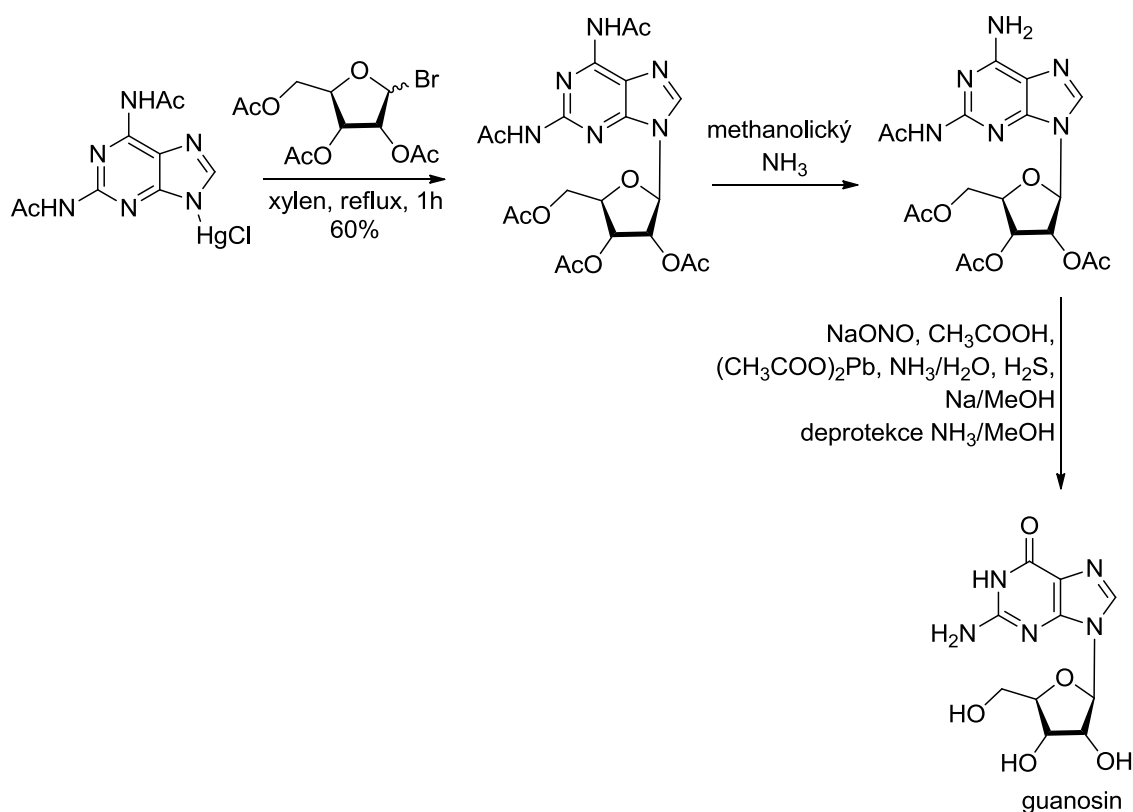
Oblast chemie zabývající se syntézou nukleosidů má své začátky v roce 1914, kdy Fischer a Helferich^[398] připojili tetra-*O*-acetyl- α -D-glukopyranosylbromid ke stříbrné soli derivátu purinu, což vedlo mj. ke vzniku 9-(β -D-glukopyranosyl)adeninu a 9-(β -D-glukopyranosyl)guaninu. Asi o třicet let později byla tato metoda použita pro přípravu adenosinu a guanosinu vycházející z 2,3,5-tri-*O*-acetyl-D-ribofuranosylchloridu^[399] (viz schéma 1).

Schéma 1:



Dalším postupem pro syntézu 9-(β)-purinových ribonukleosidů byla „rtuťnatá metoda“ využívající Hg²⁺ soli ke zvýšení výtěžnosti reakce uvedená Davollem a Lowym roku 1951^[400]. Z chloromerkuri-6-benzamidopurinu (vzniklým srážením příslušné báze s HgCl₂) a 2',3',5'-tri-*O*-acetyl-D-ribofuranosyl chloridu (bromidu) byl získán adenosin a obdobně s využitím chloromerkuri-2,6-diacetamidopurinu mohl být připraven guanosin (viz schéma 2).

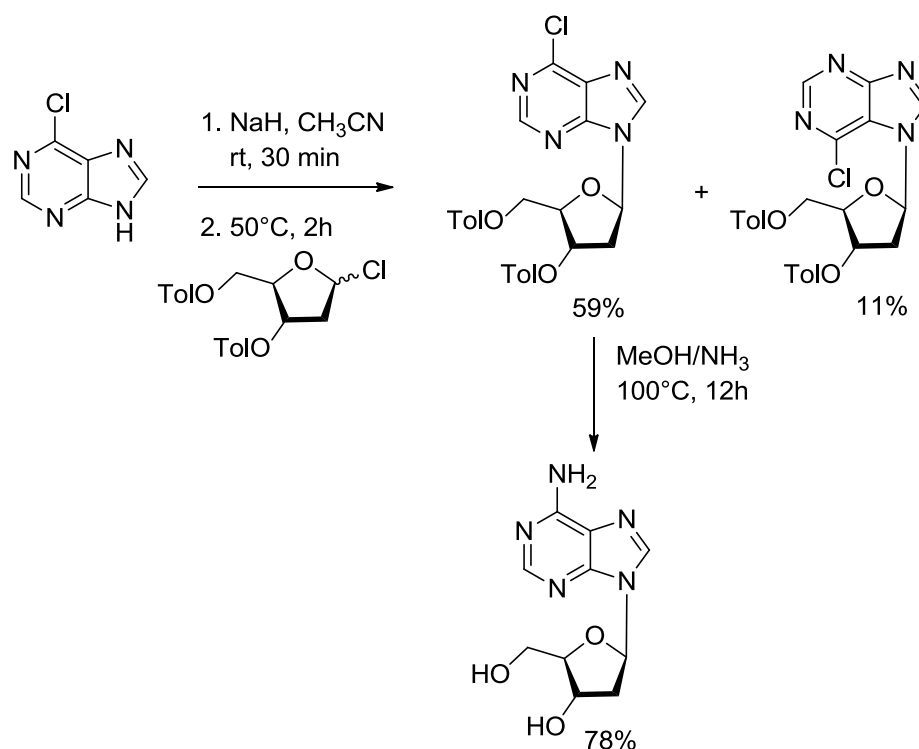
Schéma 2:



U pyrimidinů zde vznikají nejprve *O*-substituované deriváty, které v přítomnosti HgCl₂ přesmykují na *N*¹-izomery a u purinových derivátů se nejprve substituuje *N*³ a až poté dojde k migraci a vzniku *N*⁹-izomeru^[307]. Důležité je, aby v poloze 2' byla acylová chránící skupina, která po odštěpení halogenidového aniontu stabilizuje vzniklý kation jako karboniový kation a ten určuje, po příchodu báze, vznik výhradně β-anomeru^[307]. Bohužel využití rtuťnatých solí je nevýhodné z toho důvodu, že je velmi obtížné odstranit stopová množství iontů rtuti, která vyvolávají falešnou biologickou aktivitu produktu^[307].

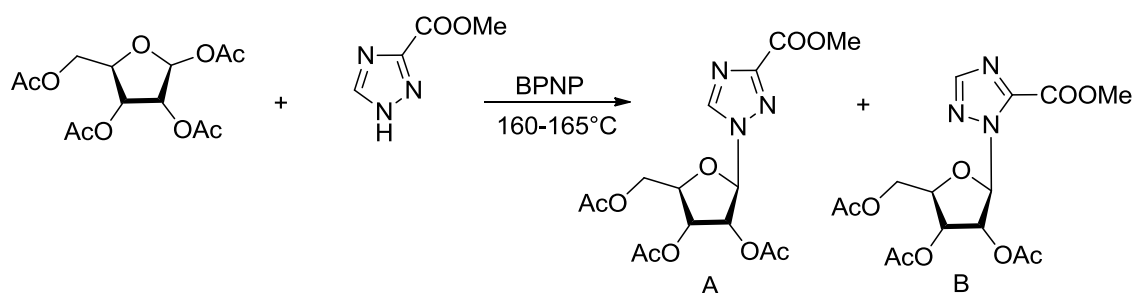
Jako méně toxická varianta rtuťnatých solí a levnější varianta stříbrných solí jsou sodné soli, které sice mají dobrou výtěžnost, ale vzniká více regioizomerů než s využitím těžkého kovu^[401] (směs *N*⁹- a *N*⁷-nukleosidů, hlavním produktem je ale *N*⁹-izomer). Robins *et al.*^[401] zde ukázali syntézu 2'-deoxytubercidinu, 2'-deoxyadenosinu a 2'-deoxynukleosidů s využitím přímé stereospecifické glykosylace s využitím sodné soli, která byla připravena *in situ* za pomoci hydridu sodného v acetonitrilu.

Schéma 3:



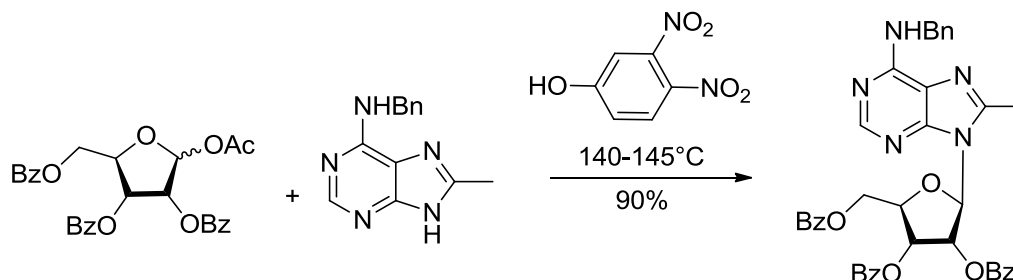
Další metodou je tzv. „fúzní metoda“ přípravy nukleosidů. Witkowski^[406] uvedl v roce 1972 syntetický postup přípravy methyl esteru kyseliny 1-(2,3,5-tri-*O*-acetyl-(β)-D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-3-karboxylové (A) a 1-(2,3,5-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-1,2,4-triazol-5-karboxylové (B), kde se methyl ester kyseliny 1,2,4-triazol-3-karboxylové zahříval spolu s 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-(β)-D-ribofuranosou při 160-165°C dokud se směs nerozpustila. Pak byl přidán BPNP (bis(*p*-nitrofenyl)fosfát, Lewisova kyselina) a zahřívání pokračovalo za sníženého tlaku 15-20 min. Krystalizací byl získán derivát A a z filtrátu pak byl sloupcovou chromatografií získán olejovitý derivát B. Výtěžnost reakce byla 85% derivátů A a B v poměru 10:1. Tato reakce byla využita např. u syntézy ribavirinu^[407].

Schéma 4:



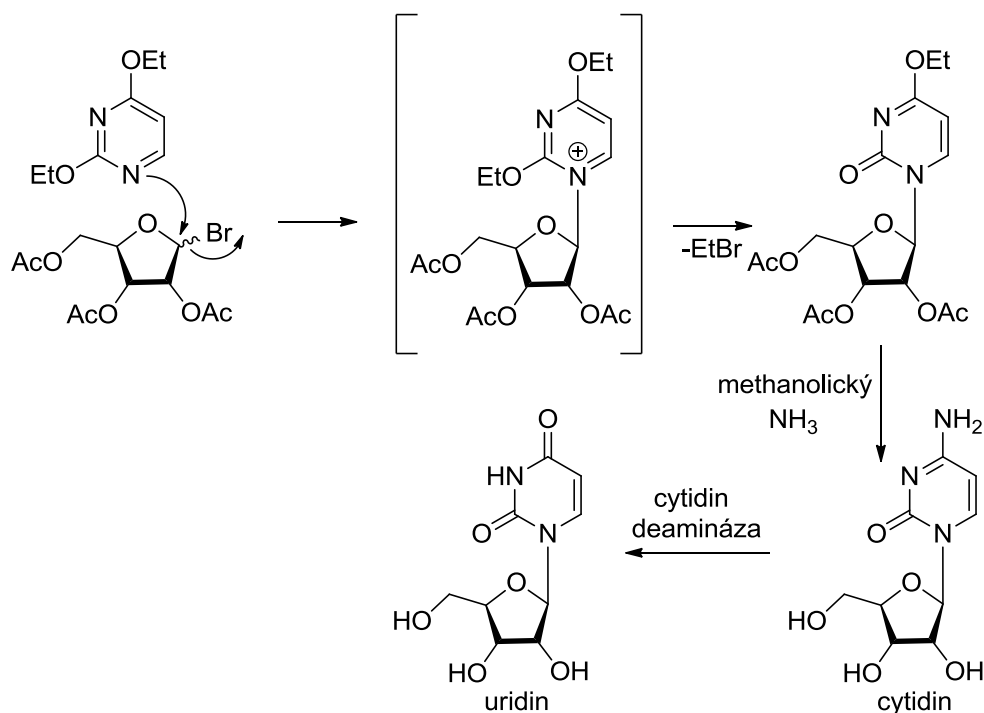
Příkladem „fúzní metody“ u purinů mohou uvést reakci derivátu 6-(*N*-benzylamino)purinu s chráněným furanosylacetátem za přítomnosti 3,4-dinitrofenolu jako Lewisovy kyseliny při teplotě 140-145°C^[408]. Kromě 3,4-dinitrofenolu lze použít také ZnCl₂, 4-toluensulfonovou kyselinu, BF₃, SnCl₄ a TiCl₄, ale vždy se bude tvořit směs anomerů.

Schéma 5:



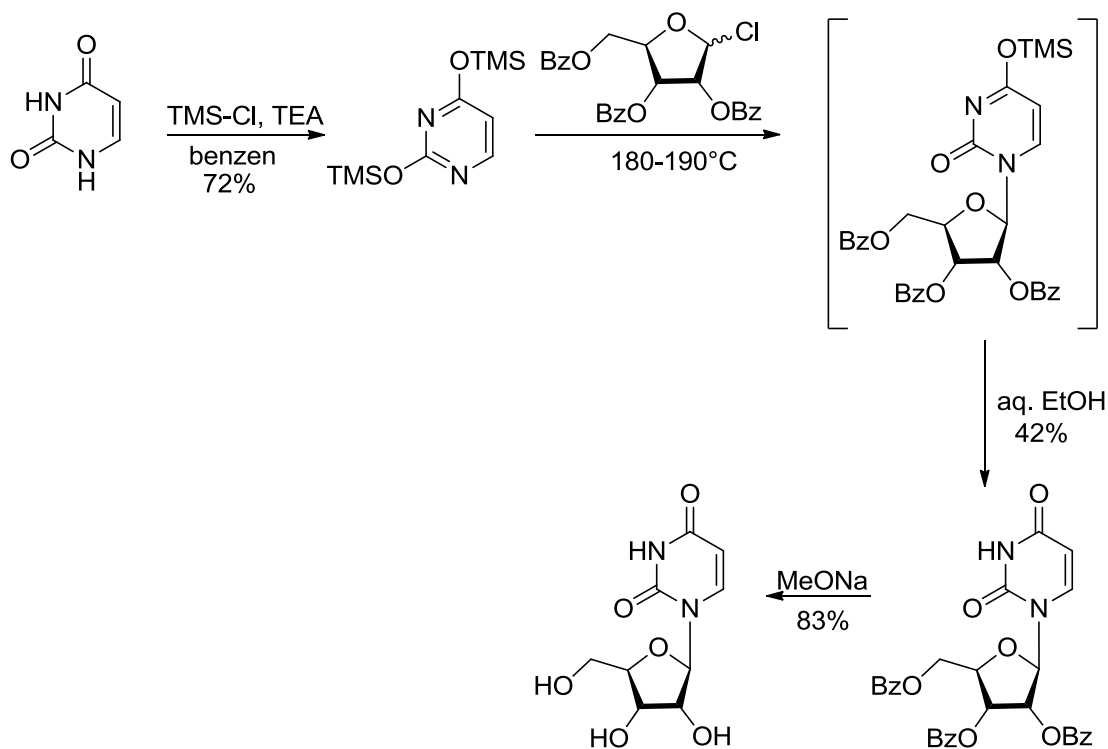
První syntézy uridinu a cytidinu využívaly Hilbert-Johnsonovu^[409,410] metodu s využitím ribosylbromidu a 2,6-diethoxypyrimidinu, jenž byl připraven z 2,6-dichloropyrimidinu s ethanolátem sodným.

Schéma 6:



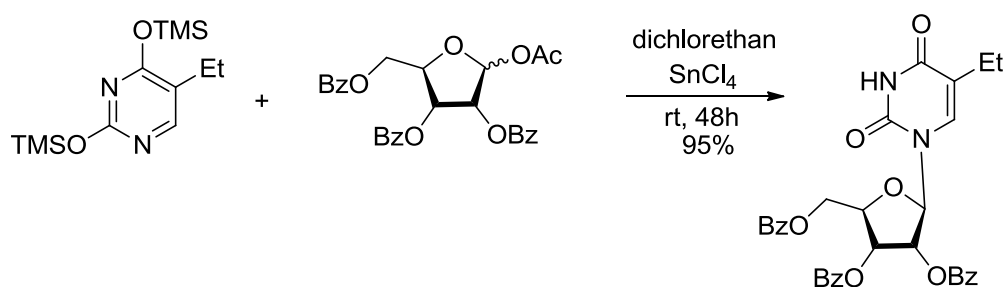
Nishimura^[411] *et al.* v roce 1963 publikovali v podstatě obměnu Birkoferovy metody *N*-acylace heterocyklických bází prostřednictvím jejich trimethylsilylových reaktivních derivátů^[412,413]. Trimethylsilyl deriváty purinů a pyrimidinů byly připraveny tehdy známou metodou^[414,415,416] a použity k fúzi s acylglykosylhalidy^[411].

Schéma 7:



Vorbrüggenova silylová metoda využívá reakci halogenosy se silylovanou pyrimidinovou nebo purinovou bází v přítomnosti SiCl₄ jako Lewisovy kyseliny. Provádí se v acetonitrilu za laboratorní teploty a výhodou je, že k hydrolýze TMS-skupin stačí přidání vody k reakční směsi^[307,417].

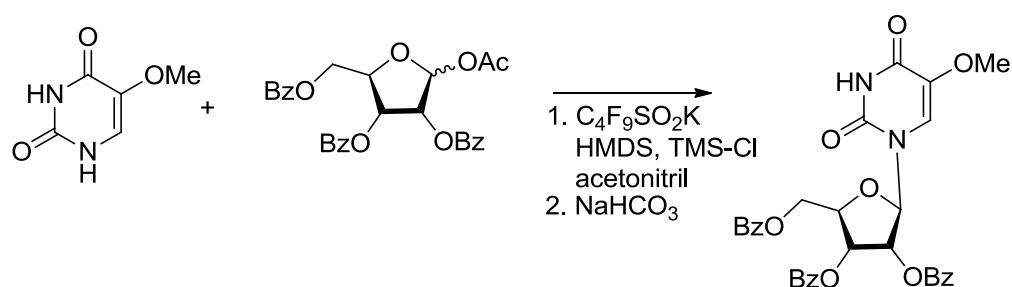
Schéma 8:



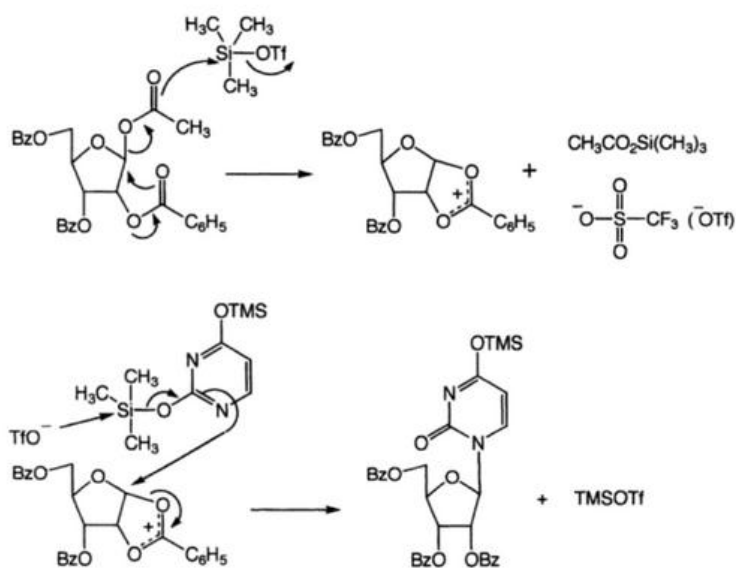
Sniady^[418] *et al.* tuto reakci v roce 2011 obměnili a provedli ji v acetonitrilu v mikrovlnném reaktoru při teplotě 150°C s využitím Brønstedovy kyseliny pyridinium triflátu jako katalyzátoru (5 mol%) a obdrželi výtěžek 98%. Pro porovnání, když tuto reakci provedli bez přítomnosti jakéhokoliv katalyzátoru, výtěžek byl nulový.

Vorbrüggen^[419] také roku 1978 publikoval možnost zjednodušení syntézy uridinových derivátů z uracilu (konkrétně např. 5-methoxyuracil) a 1'-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosy, kde není potřeba nejprve silylovat příslušnou bázi, ale k silylaci i ke vzniku nukleosidu dochází v jednom reakčním kroku. Místo v dichlorethanu se reakce provádí v acetonitrilu a místo katalyzátoru SnCl_4 se používá $\text{C}_4\text{F}_9\text{SO}_2\text{K}$ (draselná sůl perfluorobutansulfonové kyseliny) a dále se do reakční směsi přidává TMS-Cl a HMDS (hexamethyldisilazan).

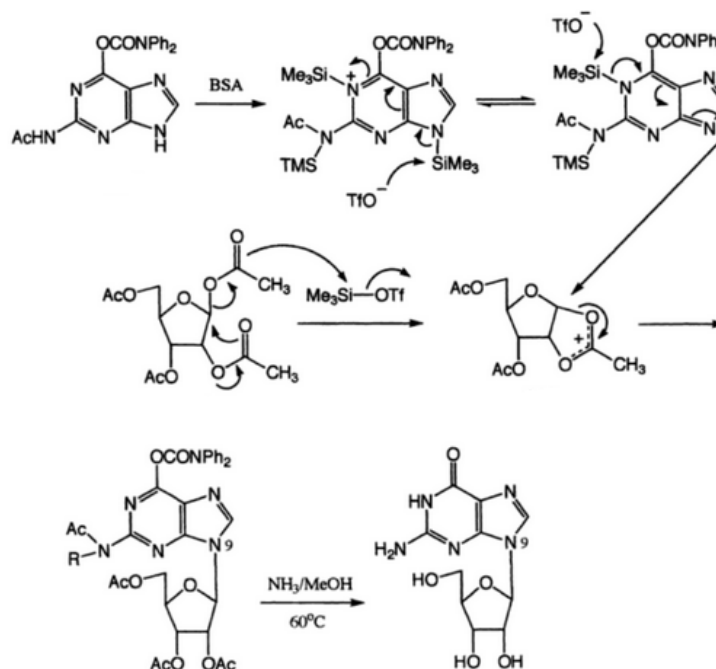
Schéma 9:



Obrázek 28: Mechanismus Vorbrüggenovy syntézy pyrimidinových nukleosidů^[420].

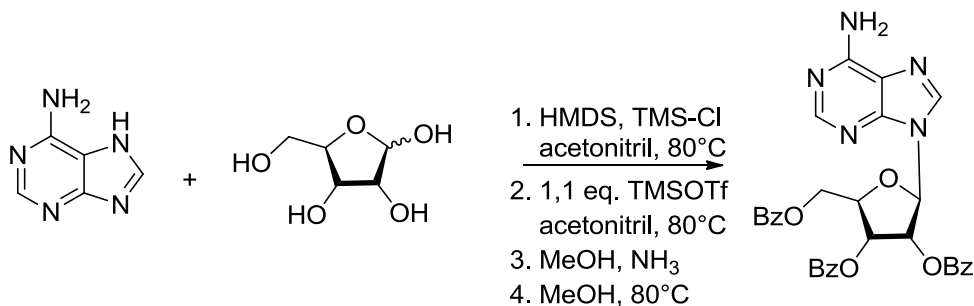


Obrázek 29: Mechanismus Vorbrüggenovy syntézy purinových nukleosidů^[420]:



Roku 1995 byl Vorbrüggenem^[421] publikován další pokrok v syntéze a to možnost využití nejen nechráněné báze, ale také cukerné části, která je ochráněna *in situ*. Tato možnost je zejména výhodná, není-li dostupná chráněná cukerná část. Bohužel není možné ji využít pro 2'-deoxyribózu.

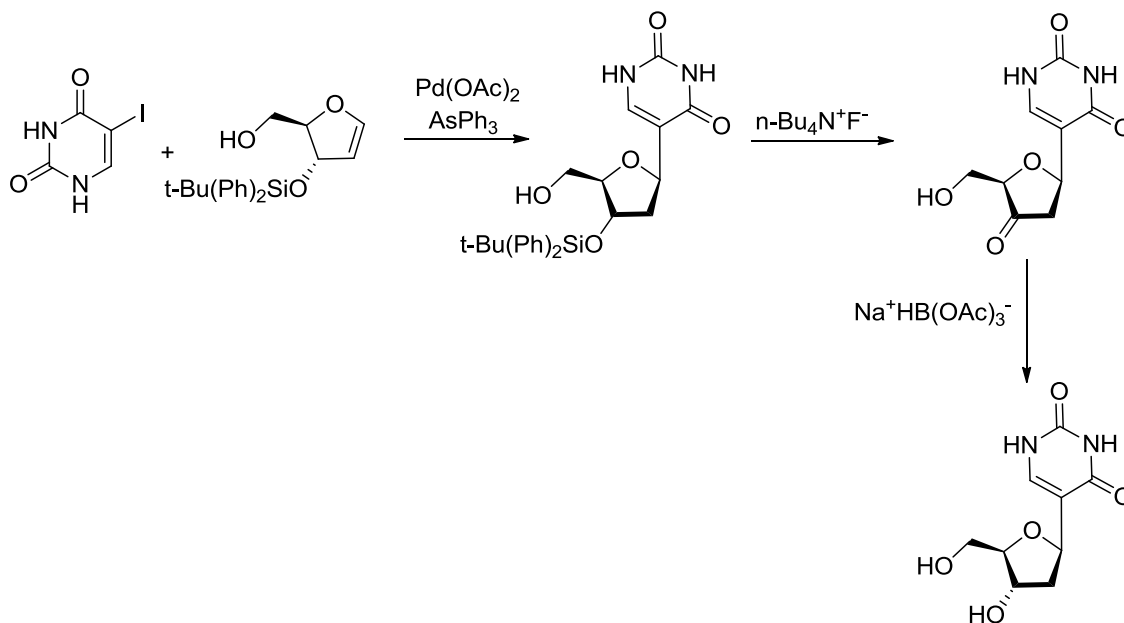
Schéma 10:



Výzkum Zhanga a Daveše^[422] z roku 1992 přinesl možnost paladiem-zprostředkované couplingové reakce pyranových a furanových glykalů (1,2-nenasycených cyklických uhlovodíků) s příslušným aglykonem pro tvorbu regio- a stereospecifické tvorby C-glykosylové vazby. Při tříkrokové přípravě 2'-deoxypseudouridinu s výtěžkem 63% byla klíčovou reakcí couplingová reakce 5-iodouracilu s 1,4-anhydro-2-deoxy-3-O-[(1,1-dimethylethyl)difenylsilyl]-D-erythro-pent-1-enitolem. Vznikl β -C-nukleosid, který byl bez izolace desilylován fluoridovými ionty za vzniku 2'-deoxy-3'-keto C-nukleosidu a nakonec triacetoxyborohydrid sodný

stereospecificky redukoval 3'-ketoskupinu z β -strany furanového kruhu a vznikl 2'-deoxypseudouridin.

Schéma 11:



Zajímavá je také možnost tvorby glykosylové vazby pomocí Mitsunobu reakce, která byla v cukerné chemii využita již roku 1979 Grynkiewiczem^[423]. Ten podrobil D-glukózu Mitsunobu podmínkám za přítomnosti nadbytku fenolu za vzniku fenylglykosidu v dobrém výtěžku a diastereoselektivitě ($\alpha:\beta$ 1:8). Schmalisch^[424] *et al.* pak v roce 2013 vyvinul neutrální katalytické podmínky pro reakci nechráněné D-ribózy v přítomnosti nadbytku alkoholového akceptoru pro termodynamický průběh reakce za vzniku převážně β -anomeru.

Schéma 12:

Grynkiewicz 1979

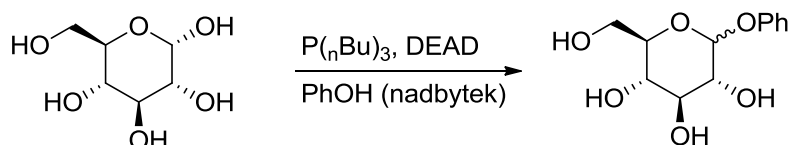
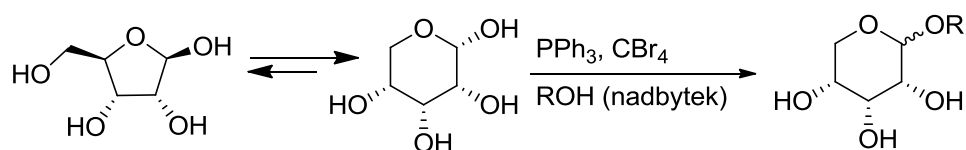


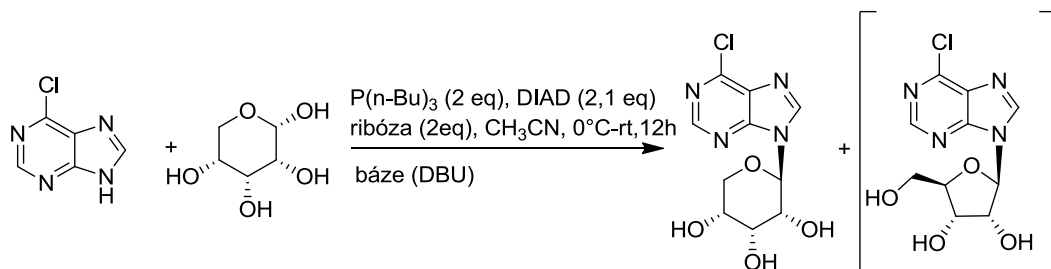
Schéma 13:

Schmalisch 2013



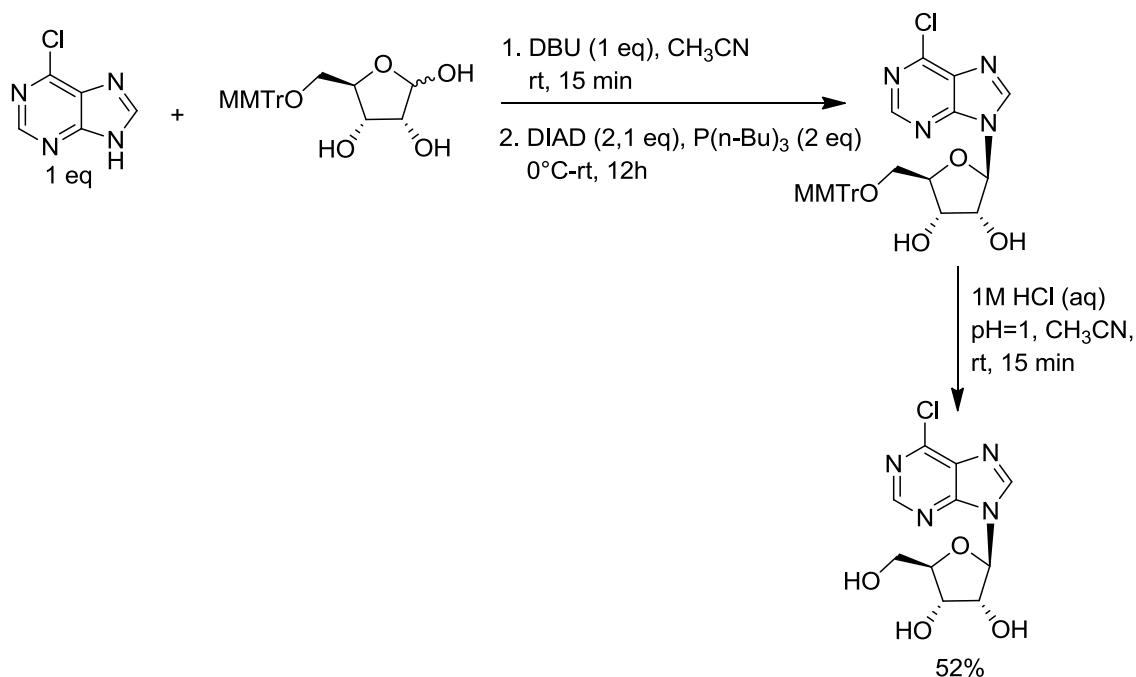
Avšak pro syntézu purinových nukleosidů často není žádoucí nutnost použití nadbytku báze jako akceptoru alkoholu, a proto Downey^[425] *et al.* v roce 2015 přišli s možností přípravy purinových i pyrimidinových nukleosidů s dobrými výtěžky β -anomeru, α -anomer nepozorovali. Pyrimidinové deriváty reagovaly poměrně hůře v porovnání s purinovými a směsi pyrano- a furanosidů byly nedělitelné sloupcovou chromatografií.

Schéma 14:



K tomu, aby produktem byl hlavně furanózový derivát, byla použita labilní protektivní skupina, která chrání 5'-OH skupinu a inaktivuje ji a hlavně uzamyká ribózu ve furanózové podobě a to 4-methoxytritylová skupina (MMTr), tritylether by byl příliš stabilní skupinou. Jako testovací bázi používali 6-chlorpurin a reakcí s ochráněnou ribózou bylo izolováno 53% produktu za uvedených podmínek (schéma 15).

Schéma 15:

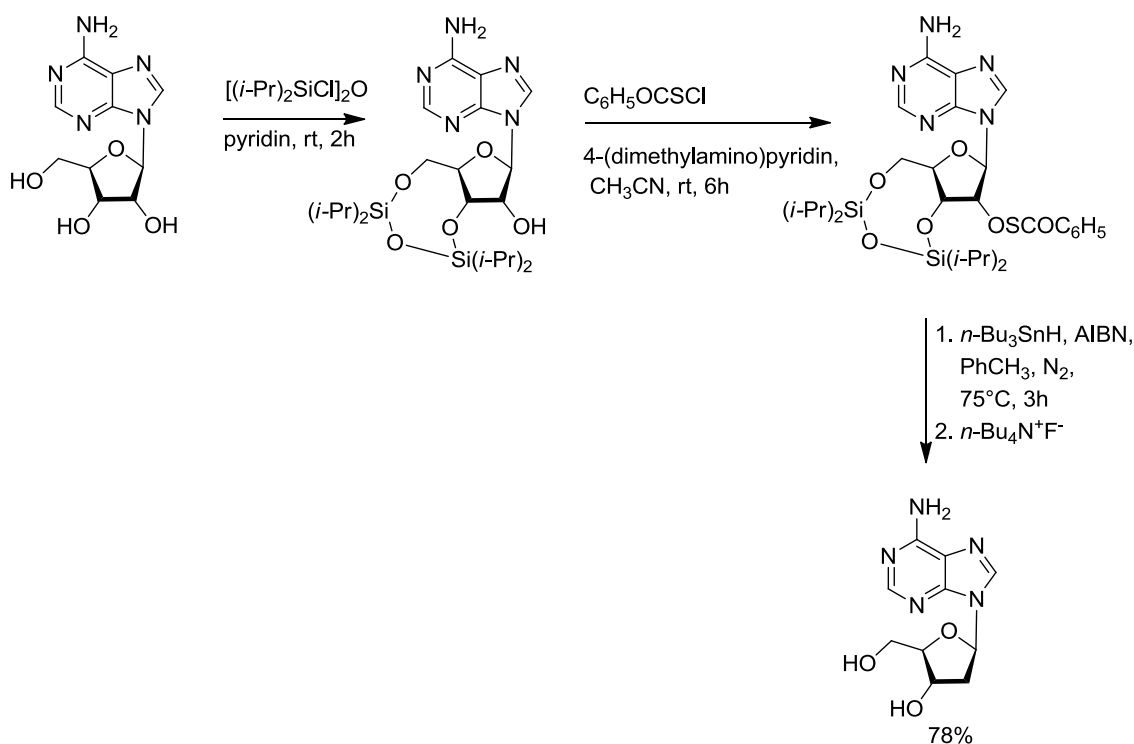


Tato Downeyho metoda bohužel také vyžaduje přítomnost 2'-OH skupiny na cukerné části, tedy když byla použita pro reakci 2'-deoxy-D-ribóza vznikla směs produktů, kterou nebylo možné rozdělit. Benzoylovými skupinami plně ochráněná ribóza, již právě benzoyl (acyl) v poloze 2' umožňuje usnadnit reakci za podmínek Vorbrüggenovy reakce, poskytla za těchto podmínek jen stopy produktu na TLC a 2',3'-isopropylidenderivát ribózy nereagoval vůbec^[425].

Možnou metodou přípravy 2'-deoxyribosidu je deoxygenace 2'-OH skupiny dle Robinse a Wilsona z roku 1981^[426] za pomoci chránicích skupin.

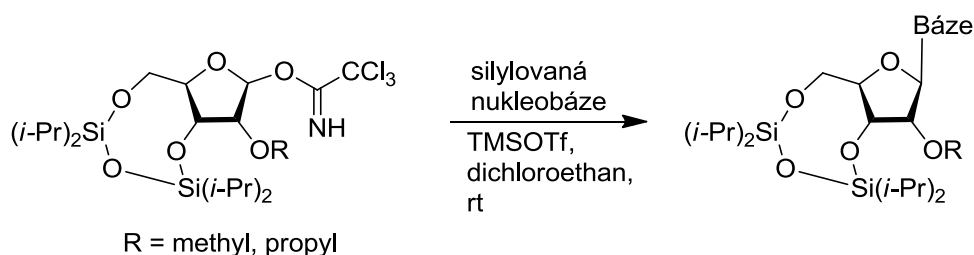
2'-Deoxyadenosin je klíčovým intermediátem k syntéze dalších 2'-deoxyribosidů. V diskuzní části bude popsáno jeho využití v syntéze cílových derivátů této práce.

Schéma 16:



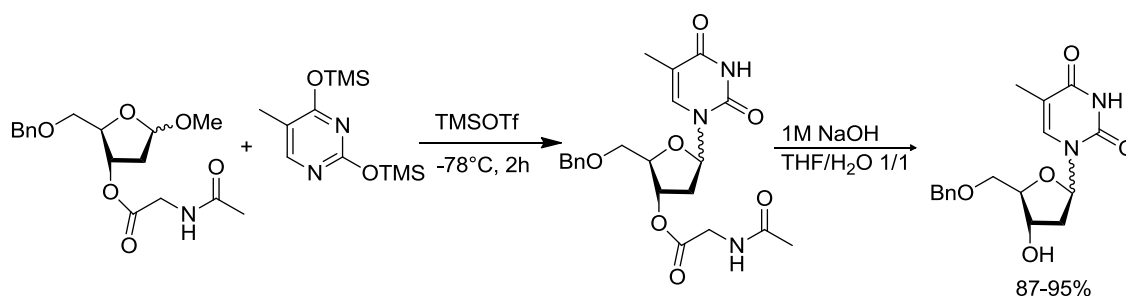
Zde uvedenou chránicí skupinu lze využít i k vazbě báze na cukernou část tak, jak ukázal Chanteloup v roce 1994. 2'-O-alkyl- β -ribonukleosidy připravil s využitím vhodně ochráněné ribózy a silylované báze za podmínek Vorbrüggenovy reakce. Glykosylace bylo dosaženo s dobrými výtěžky a vysokou stereoselektivitou.

Schéma 17:



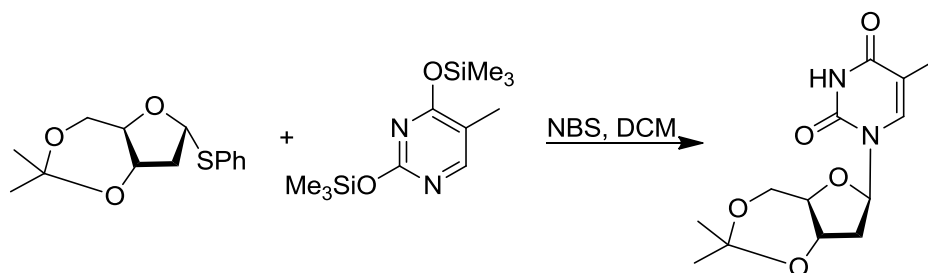
Kromě deoxygenační metody lze 2'-deoxy- β -ribonukleosidy připravit za použití vhodně chráněné 2'-deoxyribózy dle Zhanga^[428] *et al.*. Protože zde nelze využít výhody zapojení 2'-O sousední skupiny, je využita vhodná skupina v 3'-O poloze (např. *N*-acetyl-glycyl), která slouží jako donor elektronů ke stabilizaci oxokarbeniového intermediátu při participaci 1' a 3' poloh. Báze se používá silylovaná.

Schéma 18:



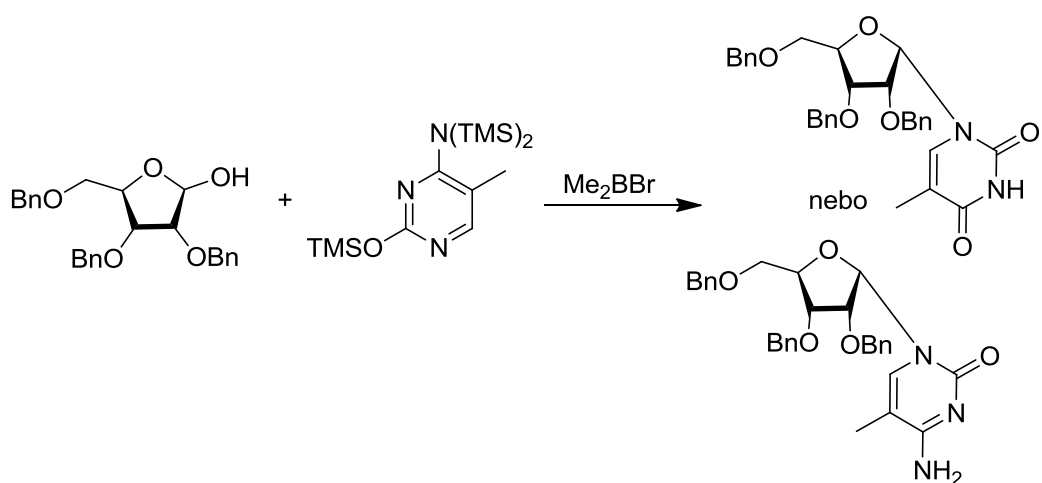
Sugimura^[429] *et al.* publikoval *N*-bromosukcinimidem podpořenou reakci mezi deoxyfuranosidy a silylovanými pyrimidinovými bázemi za vzniku převážně β -nukleosidů. Hannesian^[430] zase zavedl NBS k aktivaci thioglykosidů. Isopropylenová skupina se za těchto podmínek ukázala jako nejlepší a v případě, že byl NBS zaměněn za NIS/TMSOTf, stereoselektivita byla ztracena.

Schéma 19:



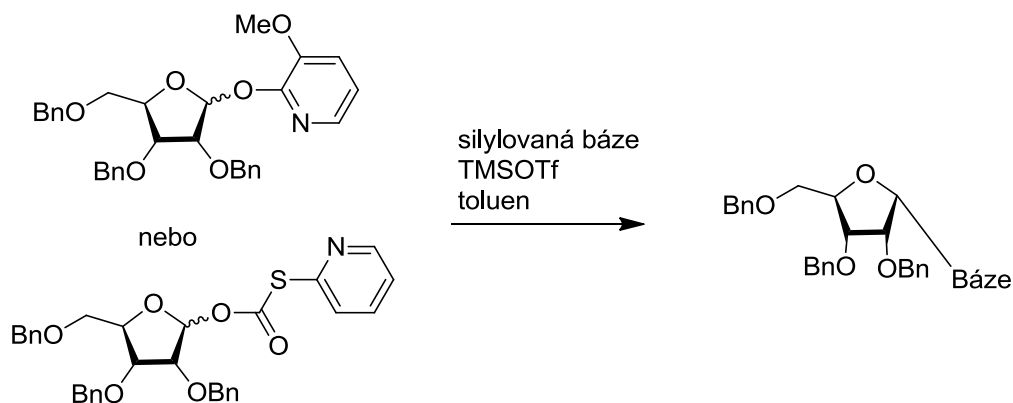
Jelikož většina studií se zabývá tvorbou v přírodě nejčastější bioaktivní 1',2'-*trans*-N-glykosylové vazby (β -nukleosidy) není mnoho způsobů jak efektivně připravit 1',2'-*cis* nukleosidy (α -nukleosidy). V porovnání s β -nukleosidy musí být pro vznik α -nukleosidů furánózová část atakována nukleofilní bází z nejvíce stericky bráněné strany, což vyžaduje více energie. Prévost^[431] publikoval vysoce diastereoselektivní cestu k 1',2'-*cis* nukleosidovým analogům v sériích D-ribo, D-lyxo, D-xylo- a D-arabinosidů. Pětičlenný kruh podléhá selektivní *N*-glykosylaci v přítomnosti bromodimethylboranu a průběh vzniku produktů je předpokládán přes S_N^2 tranzitní stavy.

Schéma 20:



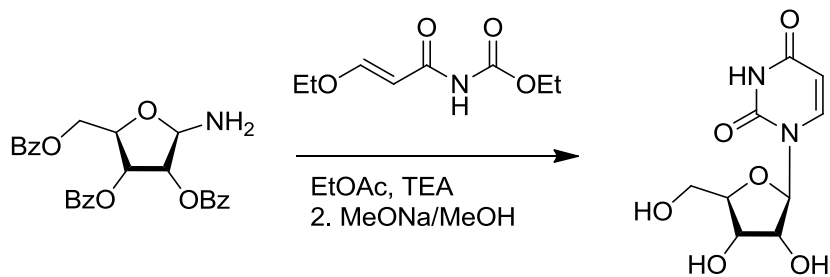
Využití 3-methoxy-2-pyridyloxidu (MOP) a 2-thiopyridylkarbonátu (TOPCAT) jako odstupujících skupin také vede ke vzniku α -anomerních nukleosidů ve výtěžku až přes 90%.^[432] Toluen je pro tuto reakci nejvhodnější v porovnání s např. benzenem, DCM, etherem a DMF; acetonitril a THF podporují vznik β -anomerů. Reakce s MOP skupinou poskytují vyšší výtěžky, ale reakční doba je obvykle dlouhá (cca 20h), kdežto reakce s TOPCAT skupinou je rychlejší (0,5-6h), ale výtěžky bývají nižší.

Schéma 21:



V neposlední řadě je nutno zmínit také metodu výstavby heterocyklického jádra na cukerné části, např. na dusíku v poloze C-1' aminoribózy, jak popsal Shaw^[433] v roce 1958. 2',3',5'-Tri-*O*-benzoyl- β -D-ribosylamin byl připraven katalytickou hydrogenací 2',3',5'-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribosylazidu získaného reakcí ribosylhalidu a azidu sodného v acetonitrilu^[434], což je rozšíření metody, kterou popsal Bertho^[435] už v roce 1930 (připravoval 2,3,4,5-tetra-*O*-acetylglukosylazid a D-glukosylamin). Průběh reakce za vzniku uridinu je zobrazen na schématu č. 22 a vedl ke vzniku směsi obou anomerů.

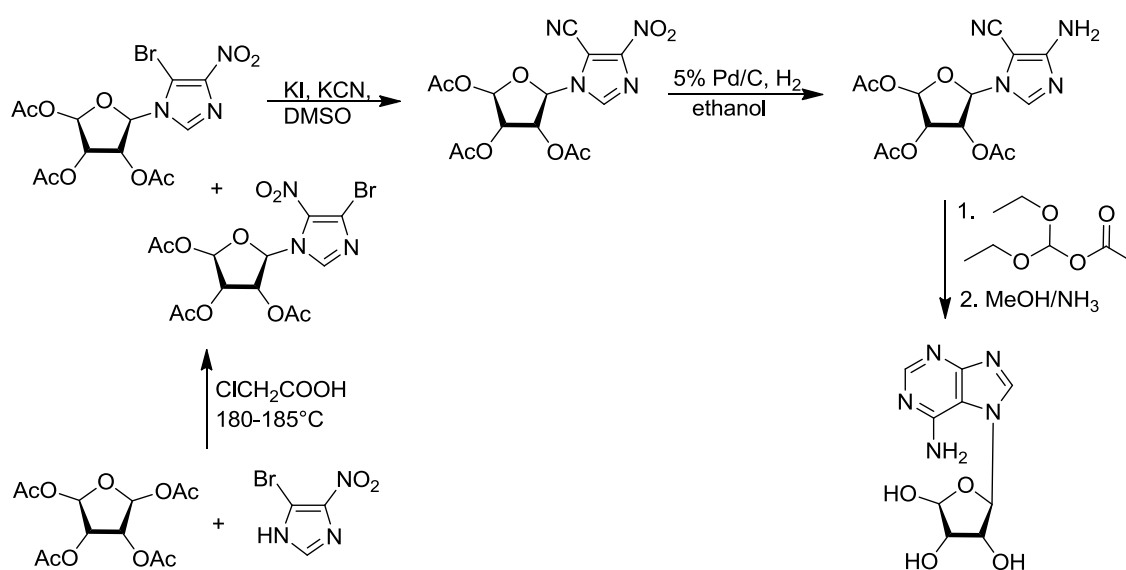
Schéma 22:



Purinové nukleosidy lze získat např. výstavbou vycházející z imidazoderivátu dle Rousseaua^[437] *et al.* z roku 1968 (příprava N^7 -izomeru). V tomto případě byl 5-bromo-4-nitro-1-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)imidazol připraven zahříváním směsi 4(5)-bromo-5(4)-nitroimidazolu s tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranózou za přítomnosti kyseliny chloroctové při 180-185°C ve výtěžku 72%. Při této reakci vznikl taktéž 4-bromo-5-nitro-1-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)imidazol, jenž byl izolován do etheru. K 5-bromo-4-nitro-1-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)imidazol byl bez deprotekčního kroku přidán jodid draselný, kyanid draselný a v DMSO vzniklo 82% 5-kyano-4-nitro-1-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)imidazolu. Následující redukce

nitroskupiny byla nejprve provedena pomocí Ra-Ni v atmosféře H_2 , ale toto vedlo ke vzniku směsí a ke ztrátě materiálu. Proto jako mnohem výhodnější byla redukce pomocí vodíku a 5% Pd/C v ethanolu, zde vzniklo 87% vyhovujícího produktu. K takto připravenému 4-amino-5-kyano-1-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-(β)-D-ribofuranosyl)imidazolu byl dále přidán diethoxymethylacetát (reflux) za vzniku 4-ethoxymethylenového intermediátu, ke kterému byl dále přidán methanolický amoniak a takto byl získán 6-amino-7-(β)-D-ribofuranosyl)purin s výtěžkem 93%.

Schéma 23:



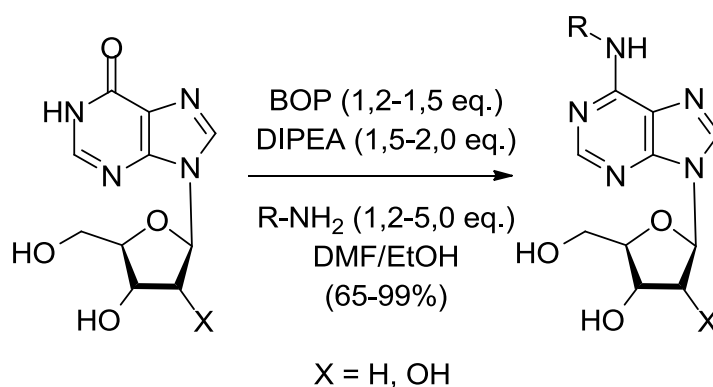
4. Diskuze a výsledky

V experimentální části práce bylo cílem připravit různě N^6 -substituované deriváty 2'-deoxyadenosinu s využitím řady různě substituovaných benzylaminů. Byly vyzkoušeny dvě rozdílné metody:

1. vedoucí z 2'-deoxyinosinu, případně jeho 3',5'-di-*O*-acetylderivátu a
2. vedoucí z 6-chloro-3',5'-di-*O*-acetyl-2'-deoxyadenosinu, jenž byl připraven z 2'-deoxyadenosinu.

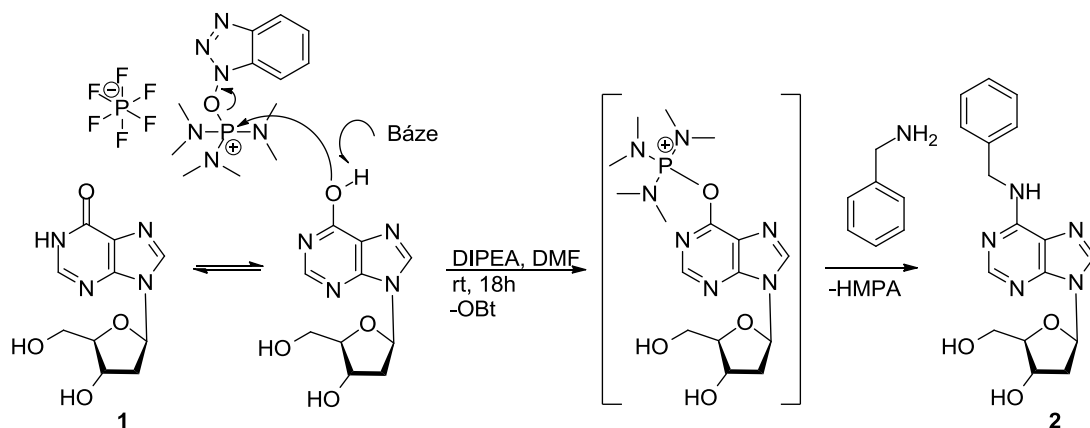
K **první metodě** byla využita jednokroková reakční cesta popsaná Wanem *et al.*^[438] v roce 2005 vycházející z nechráněného inosinu nebo 2'-deoxyinosinu.

Schéma 24: Obecné reakční schéma z literatury^[438]



Tato reakce byla nejprve vyzkoušena k přípravě N^6 -benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (BAPdR, **2**) s výtěžkem 25% a čistotou 98,5% (viz Exp. část).

Schéma 25: Mechanismus jednokrokové syntézy N^6 -benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu z 2'-deoxyinosinu



Nadšení ale vystřídal zklamání při pokusech o totožnou reakci se substituovanými benzylaminy (byly použity deriváty 2-hydroxy, 2-hydroxy-3-methoxy, 3-methoxy, 2-methyl, 3-methyl a 4-methylbenzylamin). U všech reakcí (schéma 25) byly vyzkoušeny různé podmínky (tabulka 5), TLC kontrola byla prováděna s mobilní fází $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ v poměru 4:1:0,05 a pro všechny tyto reakce byla snaha o rozdělení směsi sloupcovou chromatografií, nicméně nikdy nebylo dosaženo uchopitelného požadovaného produktu. Vždy vznikla nedělitelná směs obsahující velké množství výchozí látky, N^6 -substituovaného purinu nebo samotného adeninu. Ani ochránění 2'-deoxyinosinu pomocí acetanhydridu v pyridinu, dle^[439], nevedlo k požadovanému cíli a použití mikrovlnného reaktoru jen mnohonásobně zkrátilo dobu, za kterou vznikla tatáž směs za 30 minut oproti cca za 2 dny bez něj.

Schéma 26: Schematické zobrazení všech reakcí provedených metodou vycházející z 2'-deoxyinosinu (1. metoda)

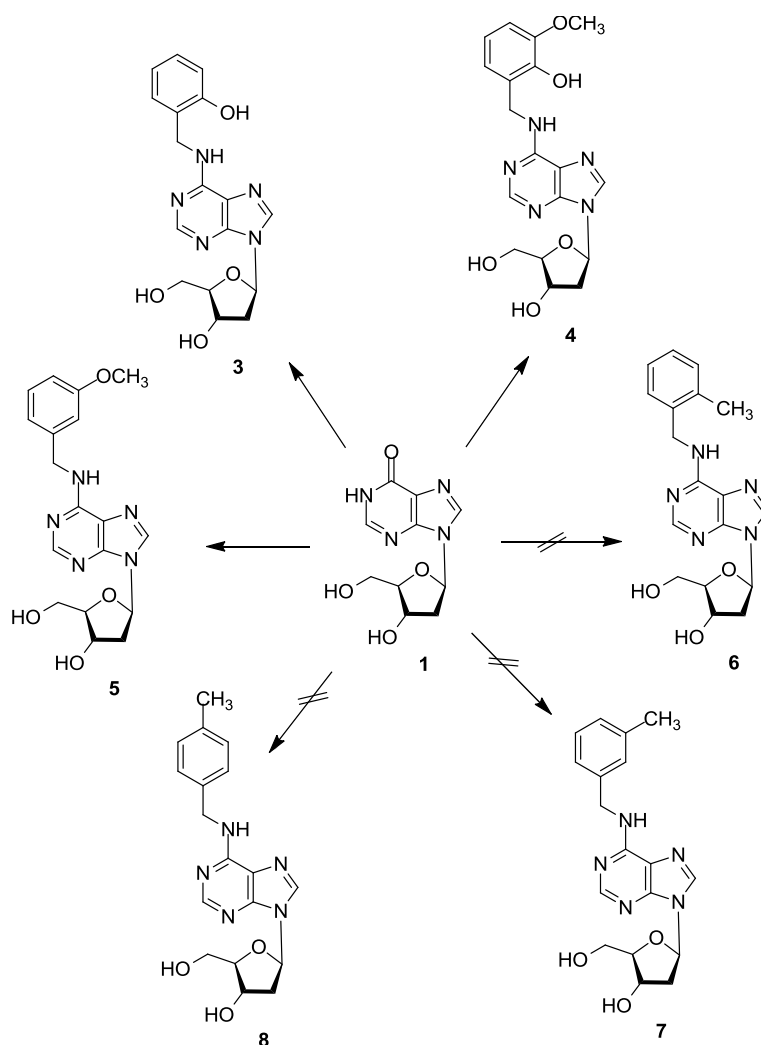
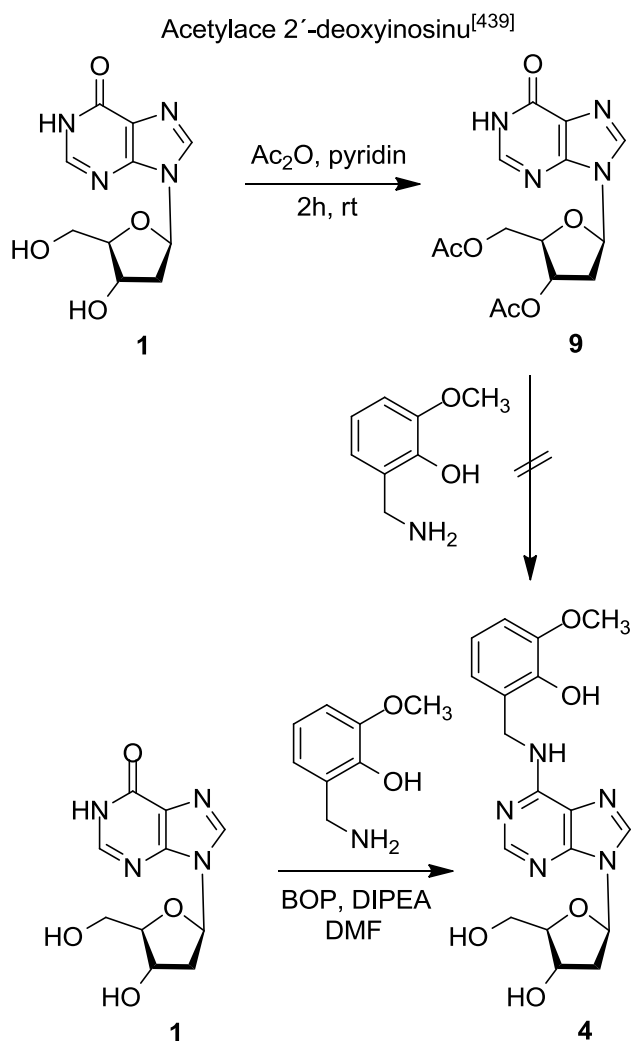


Schéma 27: Využití 3' a 5' chráněného 2'-deoxyinosinu^[439] k pokusu přípravy derivátu **4**



Tabulka 5: Shrnutí reakčních pokusů metodou vycházející z 2'-deoxyinosinu či jeho 3',4'-di-O-acetyl-derivátu

Požadovaný produkt	Reakční komponenty	Reakční podmínky	Výsledek
3	2'-deoxyinosin (1) 1 eq.	1a. 12h/rt	1. 25% HPLC-MS
	BOP 1,5 eq.	1b. 3h/50°C	a stále značný podíl
	DIPEA 2 eq.	1c. 2h/60°C	výchozí látky (TLC)
	2-OH-BA 1 eq.	1d. + 0,3 eq. BOP	pracné a neúspěšné
	DMF	18h/60°C	čištění sloupcovou
	inert. atm.	2. MW reaktor 50W	chromatografií
		30 min/80°C	2. obdobný výsledek

4	2'-deoxyinosin (1)	1 eq.	1a. 12h/rt	1. 22% HPLC-MS
	BOP	1,5 eq.	1b. 3h/50°C	nedělitelná směs
	DIPEA	2 eq.	1c. 2h/60°C	a stále značný podíl
	2-OH-3-OMe-BA	1 eq.	1d. 18h/60°C	výchozí látky (TLC)
	DMF		2. MW reaktor	
	inert. atm.		50W 30 min/80°C	2. obdobný výsledek
5	2'-deoxyinosin (1)	1 eq.	1a. 48h/rt	1. i 2. Produkt detekován v
	BOP	1,5 eq.	1b. + 0,5 eq. BOP	minimálním množství
	DIPEA	2 eq.	3h/50°C	
	3-OMe-BA	1 eq.	1c. 18h/70°C	
	DMF		2. MW reaktor	
	inert. atm.		50W 30 min/80°C	
6	2'-deoxyinosin (1)	1 eq.	1a. 18h/rt	Produkt nedetekován
	BOP	1,5 eq.	1b. 1h/50°C	
	DIPEA	1,8 eq.	1c. 18h/50°C	
	2-CH ₃ -BA	1,5 eq.		
	DMF			
	inert. atm.			
7	2'-deoxyinosin (1)	1 eq.	1. 18h/50°C	Produkt nedetekován
	BOP	1,5 eq.		
	DIPEA	1,8 eq.		
	3-CH ₃ -BA	1,5 eq.		
	DMF			
	inert. atm.			
8	2'-deoxyinosin (1)	1 eq.	1. 18h/50°C	Produkt nedetekován
	BOP	1,5 eq.		
	DIPEA	1,8 eq.		
	4-CH ₃ -BA	1,5 eq.		
	DMF			
	inert. atm.			
4	3',5'-di-O-acetyl- 2'-deoxyinosin (9)	1 eq.	1. 48h/rt	1. i 2. Produkt nedetekován
	BOP	1,5 eq.	2. MW reaktor	
	DIPEA	2 eq.	50W	
	2-OH-3-OMe-BA	1 eq.	30 min/80°C	
	DMF			
	inert. atm.			

Je možné, že oproti samotnému benzylaminu způsobuje substituce v jakékoli poloze benzenového jádra elektrondonorní skupinou oslabení reaktivity a že substituenty se záporným mezomerním efektem by reaktivitu naopak zvýšily. Tato metoda bude nadále předmětem studia, nicméně metoda druhá, vycházející z 2'-deoxyadenosinu, se ukázala být spolehlivější.

Druhá metoda vycházela z 2'-deoxyadenosinu (**10**), u něhož byly chráněny hydroxylové skupiny pomocí acetanhydridu v pyridinu za vzniku **11**^[440]. S takto získaným meziproduktem byla provedena deaminační-chlorační reakce dle literatury^[441] z roku 2003. Tak byl získán chlorovaný intermediát (**12**) k přípravě všech cílových derivátů.

Schéma 28: Schematické zobrazení reakčních kroků vedoucích k hlavnímu intermediátu (**12**) druhé metody přípravy cílových derivátů

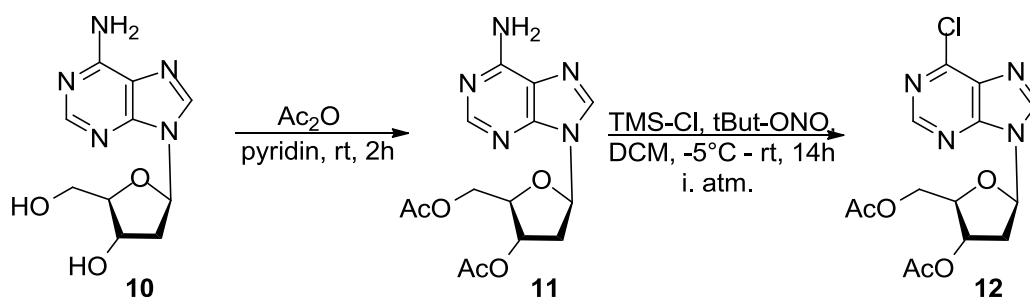
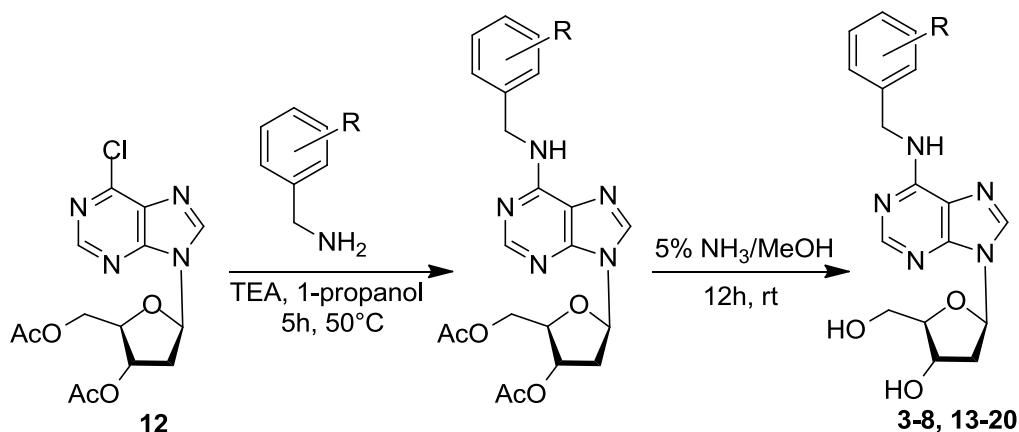
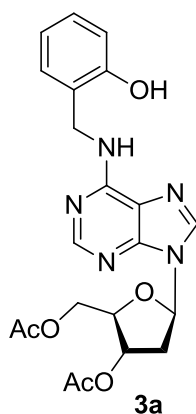


Schéma 29: Obecné schéma nukleofilní substituce intermediátu **12** a příslušně substituovaného benzylaminu na motivy literatury^[442] a následná deprotektace hydroxylových skupin

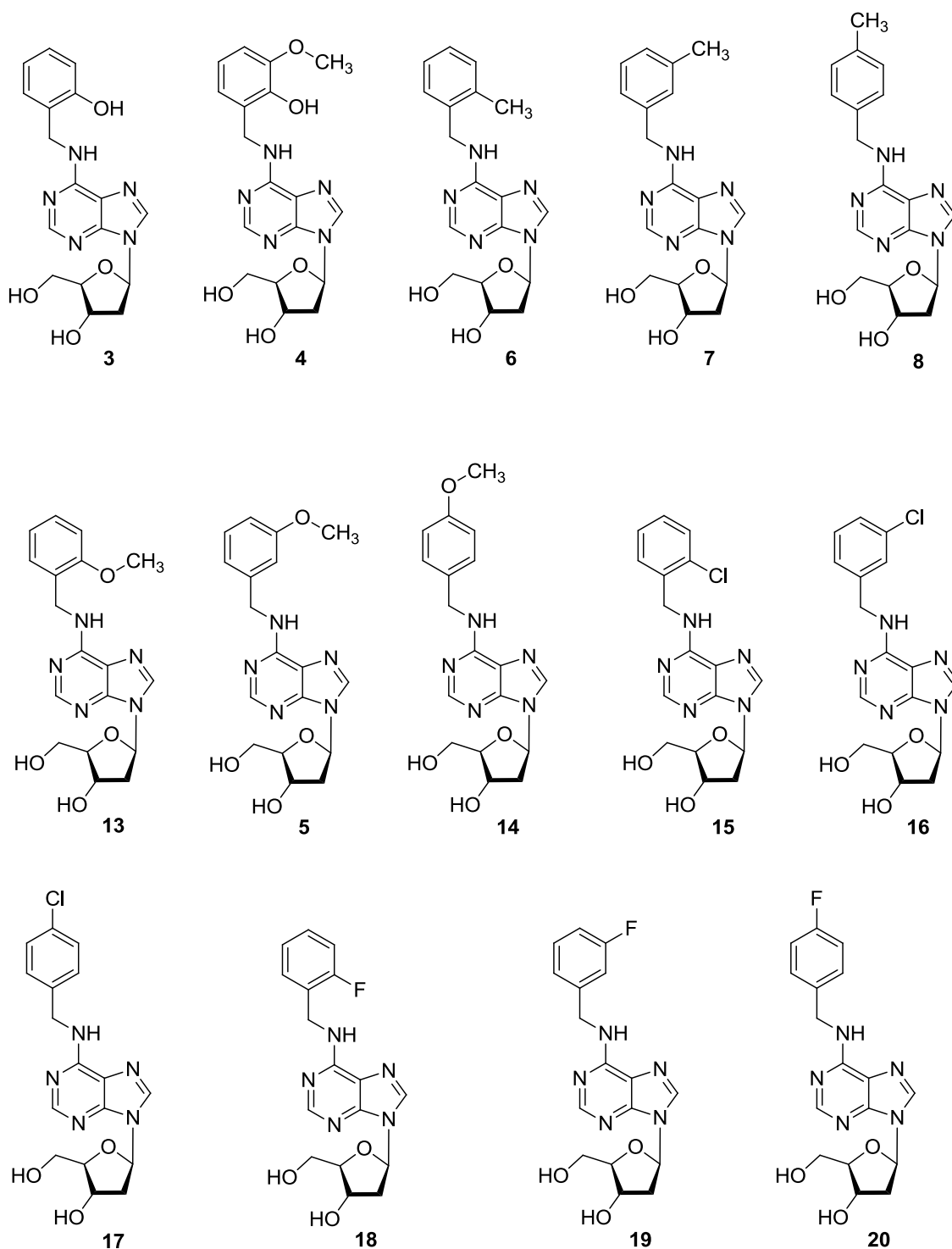


Ve formě 3',5'-di-O-acetyl derivátu byl pomocí sloupcové chromatografie izolován pouze derivát **3a**, nicméně nebylo možné touto separační metodou získat produkt s čistotou nad 90%, proto byla reakce vedoucí k **3** a ostatním dále prováděna bez separace chráněného produktu a rovnou se pokračovalo deprotekčním krokem. 3' a 5'-diacetylované deriváty budou předmětem dalšího studia, bude ale nutné vycházet z většího množství výchozího chlorderivátu **12**.

Obrázek 30: Struktura derivátu **3a**



Obrázek 31: Shrnutí 14 připravených nových N^6 -substituovaných derivátů 2'-deoxy-9-(β)-D-adenosinu



Tabulka 6: Shrnutí výtěžností reakcí a čistot připravených 14 nových N^6 -substituovaných derivátů 2'-deoxy-9-(β)-D-adenosinu a také derivátu **3a**

Derivát	Výtěžek	Čistota HPLC-MS	Vzhled
3	19%	97,4%	Bílá až nažloutlá pevná látka
3a	41%	86%	Žlutohnědá amorfnní látka
4	32%	96,8%	Žlutooranžová pevná látka
5	20%	90,4%	Světle žlutá amorfnní látka
6	25%	95,2%	Světle žlutá amorfnní látka
7	28%	98%	Světle žlutá amorfnní látka
8	27%	90,20	Světle žlutá amorfnní látka
13	24%	94,3%	Světle žlutá amorfnní látka
14	9%	94,4%	Bílá pěna
15	31%	96,7%	Nažloutlý pevný odparek
16	30%	94,2%	Nažloutlý pevný odparek
17	29%	99,5%	Bílá pěna
18	44%	98,2%	Bílá pěna
19	34%	96,6%	Bílá pěna
20	23%	93,1%	Bílá lehce nažloutlá pěna

Derivátů **3** a **4** bylo dosaženo v poměrně vysoké čistotě bez nutnosti separace sloupcovou chromatografií, pomocí krystalizace. Bylo však nutné vyzkoušet různá rozpouštědla (methanol, ethanol, 1-propanol, aceton) a každá z těchto dvou látek vykrystalizovala v jiném rozpouštědle. Konkrétně derivát **3** vykrystaloval z 1-propanolu a derivát **4** z absolutního ethanolu a přitom byla vyzkoušena všechna zmíněná rozpouštědla. Krystalizační proces vždy probíhal po dobu minimálně dvou dní. Z tohoto časového důvodu bylo u dalších derivátů přikloněno spíše k separaci sloupcovou chromatografií. Je nutno zmínit urychlení separace u derivátů **16-20** pomocí metody preparativní TLC na skleněné destičce, která byla nejvhodnější jak z důvodu času, tak z důvodu eliminace značných ztrát produktů, jelikož reakce vždy vycházely z navážky okolo 100 mg intermediátu **12**.

5. Experimentální část

Materiál a metody

Použité metody

Tenkvrstevná chromatografie: TLC na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA); vizualizace desek s nanaesenými vzorky pomocí UV lampy (Camag) o vlnové délce 254 nm nebo 366 nm.

Preparativní tenkovrstevná chromatografie: TLC na skleněných deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA); vizualizace desek s nanaesenými vzorky pomocí UV lampy (Camag) o vlnové délce 254 nm nebo 366 nm.

Nukleární magnetická rezonance (NMR): Varian 500 MHz (^1H , ^{13}C) a použita byla deuterovaná rozpouštědla CDCl_3 a DMSO-d^6 .

Hmotnostní spektra: hmotnostní spektrometr Waters ZMD 2000 s využitím pozitivní ionizace elektronsprejem. Detekce snímání kladných iontů probíhala ve full scan módu v rozmezí m/z 50-800 Da.

Použité chemikálie

Reakční komponenty: Sigma Aldrich

2'-deoxyinosin, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát (BOP), diisopropylethylamin (DIPEA), 2'-deoxyadenosin, trimethylsilylchlorid (TMS-Cl), *tert*-butylnitrit, benzylamin, 2-hydroxy-3-methoxybenzylamin, 2-hydroxybenzylamin, 2-, 3-, 4-methylbenzylamin, 2-,3-,4-methoxybenzylamin, 2-,3-,4-chlorobenzylamin, 2-, 3-, 4-fluorobenzylamin, MgSO_4 , NaHCO_3 , triethylamin (TEA)

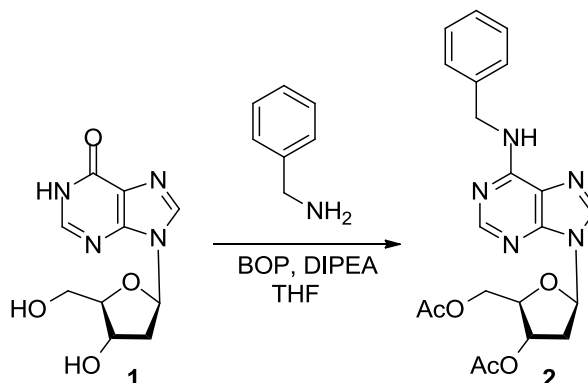
Rozpouštědla: Lach-Ner, Sigma Aldrich, OlChemIm

Methanol, ethanol, 96% ethanol, aceton, suchý dimethylformamid (DMF), propan-1-ol, diethylether, ethylacetát, methyl-*tert*-butyl ether (MTBE), voda, chloroform, dichlormethan (DCM), nasycený roztok NaCl, 7M methanolický roztok amoniaku, pyridin, acetanhydrid, toluen

5.1 Syntéza

Příprava *N*⁶-benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu^[438] (2)

Reakční schéma:



Postup:

2'-Deoxyinosin (252 mg; 1 mmol) byl předložen do baňky s kulatým dnem a rozpuštěn v 5 ml suchého DMF. Poté bylo přidáno Castrovo činidlo (BOP; 531 mg; 1,5 mmol), benzylamin (131 μ l; 1,5 mmol) a DIPEA (261 μ l; 1,5 mmol). Reakční směs byla inertizována proudem argonu a po uzavření míchána za laboratorní teploty přes noc. Došlo k rozpuštění pevné fáze a ke vzniku nažloutlého roztoku. Jakmile bylo pomocí TLC detekováno ukončení reakce (stopy výchozí látky), byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparec. Nahnědlý olejovitý odparek byl poté po přidavku vody (50 ml) extrahován ethylacetátem (3x 25 ml) a spojené organické fáze byly vysušeny MgSO_4 a odpařeny na RVO do sucha. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií (mobilní fáze stejného složení jako u TLC) a po opětovném odpaření do sucha rozpuštěn v acetonu, z něhož vykristaloval ve formě „sněhu“.

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$

Molární hmotnost: 341,36 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH:25% roztok NH_4OH (4:1:0,05)

Výtěžek: 25%

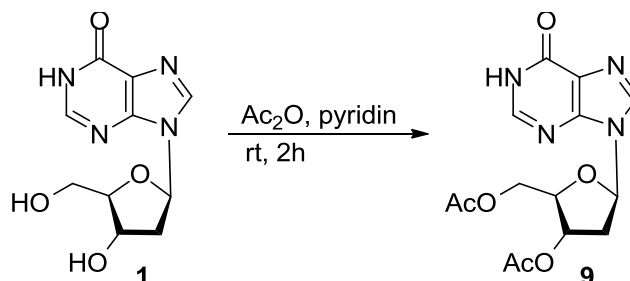
HPLC-MS (ESI^+): 98,5%

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2,19-2,23 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{A}}$); 2,65-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{B}}$); 3,45-3,48 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{A}}$); 3,55-3,58 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{B}}$); 3,82-3,84 (q, $J=10$, 1H, $\text{C}^{4'}\text{-H}$); 4,35-5,36 (t, $J=5$, 1H, $\text{C}^{3'}\text{-H}$); 4,65 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{-benzylu}$); 5,12-5,26 (bd, 1H, OH); 6,29-6,32 (t, $J=15$, 1H, $\text{C}^{1'}\text{-H}$); 7,27-7,28 (d, $J=5$, 2H, $2\times(o\text{-Ar-H})$); 7,22-7,25 (t, $J=15$,

2H, 2x(*m*-Ar-H)); 7,14-7,17 (t, *J*=15, 1H, *p*-Ar-H); 8,15 (s, 1H, C⁸); 8,32 (s, 1H, C²); 8,43 (bs, 1H, N⁶H)

Příprava 3',5'-di-*O*-acetyl-2'-deoxyinosinu^[439] (9)

Reakční schéma:



Postup:

K roztoku 2'-deoxyinosinu (297 mg; 1,18 mmol) v bezvodém pyridinu (23 ml) byl přidán acetanhydrid (1 ml) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 2 hodiny. Po této době byl odpařen pyridin do sucha a odparek byl ponechán krystalovat z vody v lednici za vzniku „jehličkového“ produktu.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₆N₄O₆

Molární hmotnost: 336,30 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH:25% roztok NH₄OH (4:1:0,05)

Výtěžek: 51%

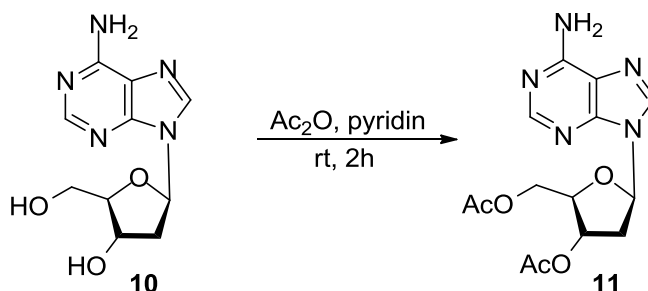
HPLC-MS (ESI⁺): 95%

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 1,97 (s, 3H, CH₃); 2,04 (s, 3H, CH₃); 2,48-2,53 (m, 1H, C^{2'}-H^A); 2,96-3,02 (m, 1H, C^{2'}-H^B); 4,13-4,16 (m, 1H, C^{5'}-H^A); 4,20-4,21 (q, *J*=10, 1H, C^{4'}-H) 4,22-4,25 (m, 1H, C^{5'}-H^B); 5,30-5,33 (m, 1H, C^{3'}-H); 6,27-6,30 (m, 1H, C^{1'}-H); 8,03 (s, 1H, C⁸); 8,26 (s, 1H, C²); 12,38 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 170,70; 157,06; 148,56; 146,51; 139,25; 125,14; 84,06; 82,25; 74,75; 64,05; 36,20; 21,33; 21,07

Příprava 3',5'-di-*O*-acetyl-2'-deoxyadenosinu (11)

Reakční schéma:



Postup:

K 1 g 2'-deoxyadenosinu. H_2O (3,8 mmol) ve 13 ml pyridinu bylo po kapkách za míchání přidáváno 3,5–4 ml acetanhydridu (80 mmol) a reakční směs byla dále ponechána za míchání 2 hodiny při teplotě laboratoře. Poté byla reakční směs ochlazená v ledové lázni a bylo přidáno 47 ml DCM, následovala extrakce s 12 ml 10% vodného roztoku NaHCO_3 a poté s 10 ml vody. Organická fáze byla odpařena do sucha a zbytková rozpouštědla byla odpařena s 3x 10 ml toluenu. Odparek byl krystalován z absolutního ethanolu v lednici přes noc. Produkt byl zfiltrován a promyt ledovým absolutním ethanolom a sušen v exikátoru nad P_2O_5 až do konstantní hmotnosti.

Sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5$

Molární hmotnost: 335,32 g/mol

TLC mobilní fáze: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

Výtěžek: 82%

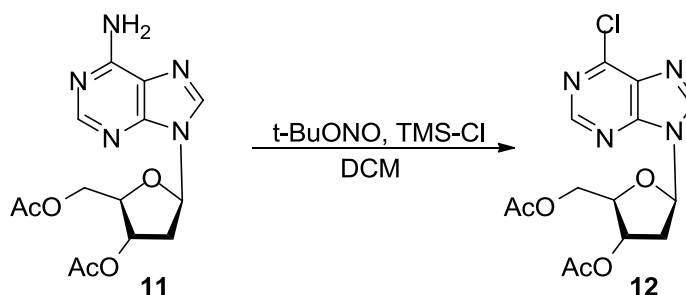
HPLC-MS (ESI^+): 99,6%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 2,08 (s, 3H, CH_3); 2,12 (s, 3H, CH_3); 2,60-2,64 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{A}}$); 2,91-2,97 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{B}}$); 4,32-4,36 (m, 2H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{A}}$, $\text{C}^{4'}\text{-H}$); 4,39-4,42 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{B}}$); 5,41-5,43 (m, 1H, $\text{C}^{3'}\text{-H}$); 5,78 (bs, 2H, NH_2); 6,41-6,44 (m, 1H, $\text{C}^{1'}\text{-H}$); 7,98 (s, 1H, C^8); 8,35 (s, 1H, C^2)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): 170,43; 155,43; 152,99; 149,72; 138,76; 120,26; 84,66; 82,63; 74,61; 63,87; 37,64; 21,04; 20,90

Příprava 6-chloro-3',5'-di-O-acetyl-2'-deoxyadenosinu (12)

Reakční schéma:



Postup:

Do řádně vysušené trojhrdlé baňky opatřené septy byl vložen 3',5'-di-O-acetyl-2'-deoxyadenosin (400 mg; 1,19 mmol) v suchém DCM (34 ml), vše bylo inertizováno pomocí N_2 (balonek) a vychlazeno za míchání v ledové lázni na 0°C . Jakmile byla směs řádně vychlazena, přes septum byl přidán TMS-Cl (1,51 ml; 12 mmol) a po chvíli byl rovněž přes septum přikapáván *tert*-butyl nitrit (0,71 ml; 5,98 mmol) v 6 ml suchého DCM. Tato reakční směs byla míchána v ledové lázni asi 2 hodiny a po odstranění ledové lázně dalších 12 h za laboratorní teploty. Na druhý den bylo k reakční směsi přidáno 170 ml DCM a 170 ml 5% vodného roztoku NaHCO_3 a organická fáze byla dále promyta 3x 50 ml vody a 3x 50 ml nasyceného roztoku NaCl , vysušena MgSO_4 a odpařena. Vznikl žlutý medovitý odparek.

Sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_5$

Molární hmotnost: 354,75 g/mol

TLC mobilní fáze: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

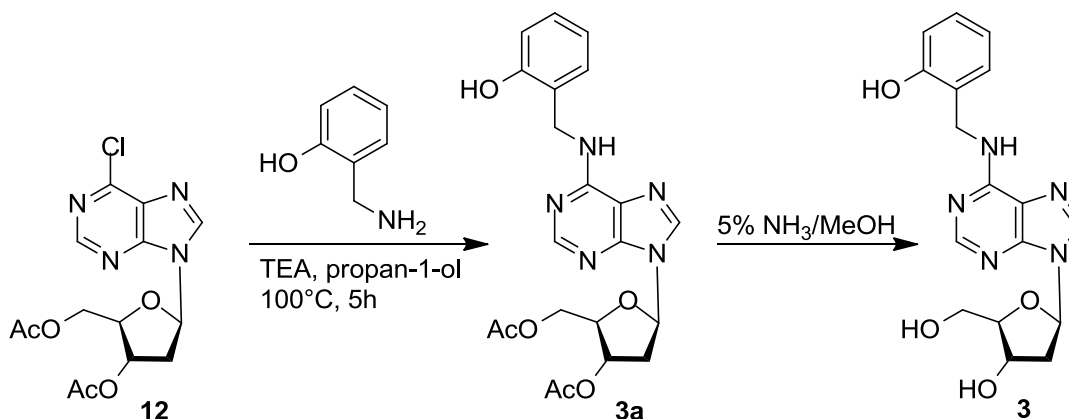
Výtěžek: 68%

HPLC-MS (ESI^+): 92%

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 2,06 (s, 3H, CH_3); 2,12 (s, 3H, CH_3); 2,65-2,69 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{A}}$); 2,94-3,00 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{B}}$); 4,08 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{A}}$); 4,21-4,25 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{B}}$); 4,35-4,40 (m, 3H); 5,41-5,43 (m, 1H); 6,46-6,49 (m, 1H, $\text{C}^{1'}\text{-H}$); 8,33 (s, 1H, C^8); 8,74 (s, 1H, C^2)

Příprava *N*⁶-(2-hydroxybenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (3)

Reakční schéma:



Postup:

Do tlakové ampule bylo vloženo (107 mg; 0,3 mmol výchozí látky **12** v 10 ml 1-propanolu. Dále bylo přidáno 37,4 mg 2-(aminomethyl)fenolu (0,3 mmol) a směs byla inertizována proudem argonu. Byl přidán triethylamin (127 µl; 0,9 mmol) a ampule byla ihned uzavřena a vložena do vyhřáté olejové lázně. Za míchání byla takto ampule ponechána 5 h při 100°C. Po ukončení reakce a vychlazení ampule na laboratorní teplotu byla směs převedena do baňky s kulatým dnem a odpařena do sucha na RVO. Odparek byl suspendován ve vodě a extrahován (15 ml MTBE s 3x 10 ml destilované vody). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena.

Pro získání derivátu **3a** byl odparek po extrakci rozdělen sloupcovou chromatografií a pro získání derivátu **3** byl odparek rozpuštěn v 10 ml 5% methanolického roztoku NH₃ a míchán za chlazení v ledové lázni 2 h a poté za laboratorní teploty 12 h. Průběh deprotektce byl sledová pomocí TLC a po ukončení reakce byla reakční směs odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml 1-propanolu a ponechán v lednici dva dny za vyloučení krystalické látky, která byla zfiltrována, promyta vychlazeným 1-propanolem a sušena v exikátoru nad P₂O₅ do konstantní hmotnosti.

Derivát 3a:

Sumární vzorec: C₂₁H₂₃N₅O₆

Molární hmotnost: 441,44 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 41%

HPLC-MS (ESI⁺): 86%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,06 (s, 3H, CH₃); 2,11 (s, 3H, CH₃); 2,58-2,62 (m, 1H, C^{2'}-H^A); 2,85-2,90 (m, 1H, C^{2'}-H^B); 4,13-4,19 (m, 1H, C^{5'}-H^A); 4,23-4,26 (m, 1H, C^{5'}-

H^B); 4,32-4,44 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,36-4,40 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,63-4,64 (bd, 2H, CH₂-benzylu); 5,38-5,40 (m, 1H, C^{3'}-OH); 6,37-6,40 (m, 1H, C^{1'}-H); 6,78-6,82 (m, 1H, Ar-OH); 6,83-6,86 (m, 1H, Ar-H); 6,92-6,94 (m, 1H, Ar-H); 7,18-7,21 (m, 2H, Ar-H); 7,93 (s, 1H, C⁸-H), 8,41 (s, 1H, C²-H)

Derivát 3:

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉N₅O₄

Molární hmotnost: 357,36 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 19%

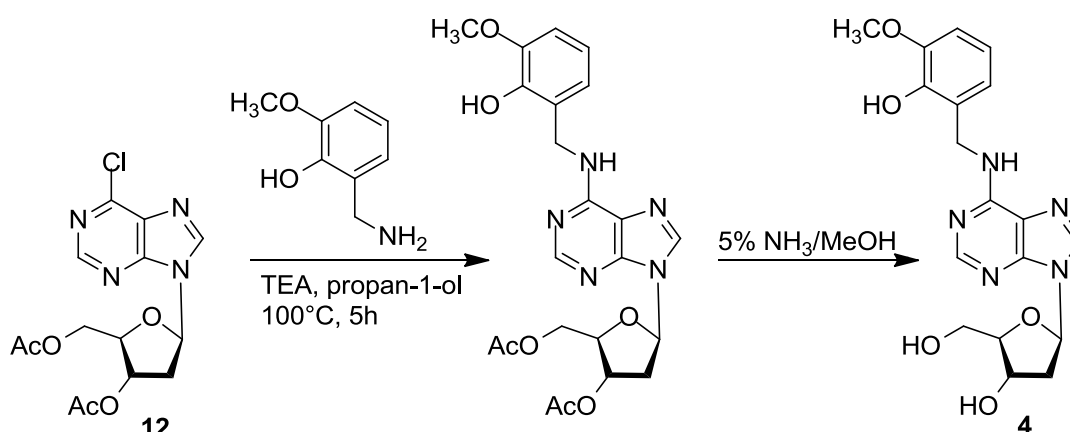
HPLC-MS (ESI⁺): 97,4%

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d⁶): 2,19-2,24 (m, 1H, C^{2'}-H^A); 2,66-2,70 (m, 1H, C^{2'}-H^B); 3,47-3,49 (m, 1H, C^{5'}-H^A); 3,82-3,84 (m, 1H, C^{5'}-H^B); 3,82-3,84 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,33-4,38 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,55 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 5,16-5,18 (t, J=10, 1H, 3'-OH); 5,28-5,29 (d, J=5, 1H, 5'-OH); 6,29-6,32 (m, 1H, C^{1'}-H); 6,64-6,67 (t, J=15, 1H, *p*-Ar-H); 6,74-6,75 (d, J=5, 1H, *o*-Ar-H); 6,98-7,04 (m, 2H, *m*-Ar-H); 8,15 (s, 1H, C⁸-H), 8,20 (bs, 1H, *o*-Ar-OH), 8,32 (s, 1H, C²-H); 9,88 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d⁶): 155,39; 154,91; 152,70; 148,70; 140,24; 128,65; 128,28; 126,12; 120,24; 119,39; 115,82; 88,52; 84,49; 71,45; 62,37

Příprava N⁶-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (4)

Reakční schéma:



Postup:

Do tlakové ampule bylo vloženo (107 mg; 0,3 mmol výchozí látky **12** v 10 ml 1-propanolu a 57 μl 2-(aminomethyl)-6-methoxyfenolu (0,37 mmol) ve formě

hydrochloridu. Po přidání 5 eq. triethylaminu (197 μ l) byla reakční směs inertizována a ponechána míchat 5 h při 100°C v olejové lázni. Po ukončení reakce byla RS odpařena do sucha na RVO a odparek byl extrahován (15 ml MTBE a 3x 10 ml vody). Organická fáze byla vysušena MgSO_4 a odpařena. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml 5% methanolického roztoku NH_3 a za chladu v ledové lázni míchán 2 h a poté 12 h za laboratorní teploty přes noc. Po určení konce reakce pomocí kontroly TLC byla RS odpařena a odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml absolutního ethanolu a vložen do lednice, kde po dvou dnech vykristaloval produkt **4** jako pevná látka. Ta byla zfiltrována, promyta ledovým absolutním ethanolom (300 μ l) a vysušena v exikátoru nad P_2O_5 až do konstantní hmotnosti.

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$

Molární hmotnost: 387,39 g/mol

TLC mobilní fáze: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

Výtěžek: 32%

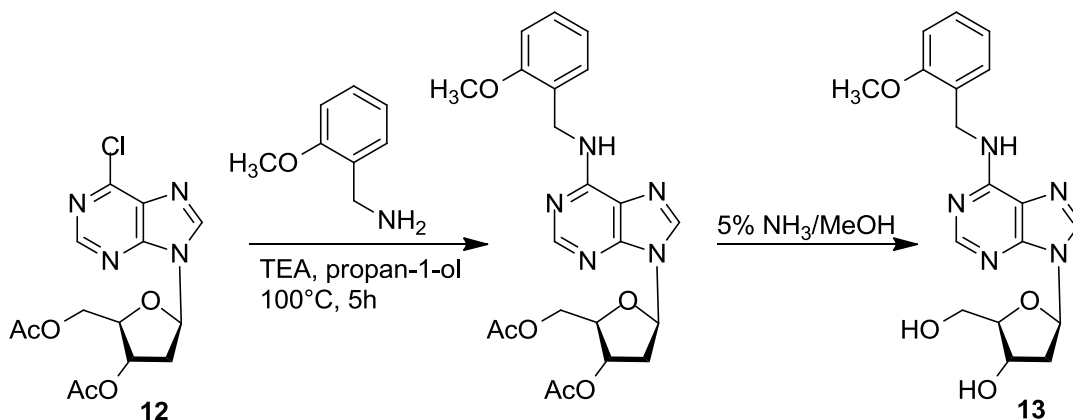
HPLC-MS (ESI^+): 96,8%

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2,18-2,23 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{A}}$); 2,64-2,69 (m, 1H, $\text{C}^{2'}\text{-H}^{\text{B}}$); 3,43-3,48 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{A}}$); 3,53-3,58 (m, 1H, $\text{C}^{5'}\text{-H}^{\text{B}}$); 3,81-3,83 (m, 1H, $\text{C}^{4'}\text{-H}$); 4,33-4,38 (m, 1H, $\text{C}^{3'}\text{-H}$); 4,55 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{-benzylu}$); 5,14-5,17 (t, $J=15$, 1H, $3'\text{-OH}$); 5,27-5,28 (d, $J=5$, 1H, $5'\text{-OH}$); 6,28-6,30 (m, 1H, $\text{C}^{1'}\text{-H}$); 6,60-6,63 (t, $J=15$, 1H, $m\text{-Ar-H}$); 6,66-6,67 (d, $J=5$, 1H, $o\text{-Ar-H}$); 6,75-6,77 (d, 1H, $p\text{-Ar-H}$); 8,15 (s, 1H, $\text{C}^8\text{-H}$), 8,21 (bs, 1H, 2-Ar-OH), 8,31 (s, 1H, $\text{C}^2\text{-H}$); 9,88 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 154,81; 152,65; 148,88; 148,22; 144,42; 140,25; 126,72; 120,66; 120,21; 119,18; 111,16; 88,51; 84,48; 71,44; 62,35; 56,29

Příprava N^6 -(2-methoxybenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (**13**)

Reakční schéma:



Postup:

Do tlakové ampule bylo vloženo 100 mg (0,28 mml) výchozí látky **12** v 10 ml 1-propanolu a bylo přidáno 36,4 μ l (0,28 mmol) 2-methoxybenzylaminu. Po přidavku 118 μ l TEA (3 eq.) byla reakční směs inertizována a zahřívána za míchání 5 h při 100°C. Po ukončení reakce a odpaření rozpouštědla následovala extrakce (15 ml MTBE + 3x 10 ml voda). Vysušená, pomocí (MgSO₄) a odpařená OF byla dále zbavena chránících skupin mícháním v 5% methanolickém roztoku (10 ml) za chladu v ledové lázni (2 h) a dále za laboratorní teploty (12 h). Na druhý den po kontrole TLC byla RS odpařena a odparek byl rozdělen sloupcovou chromatografií (MF jako pro TLC). Byl získán produkt **13**.

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁N₅O₄

Molární hmotnost: 371,39 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 24%

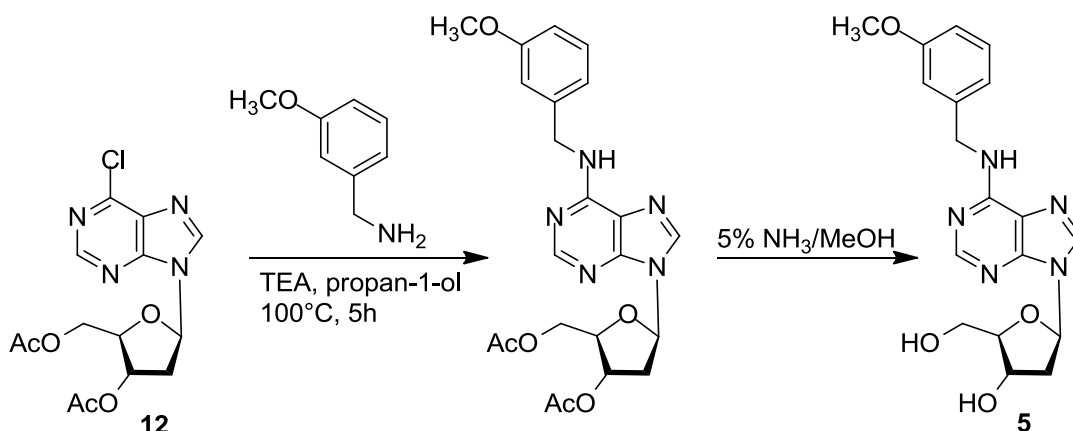
HPLC-MS (ESI⁺): 94,3%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,24-2,28 (m, 1H, C^{2'A}-H); 3,04-3,10 (m, 1H, C^{2'B}-H); 3,74-3,78 (m, 1H, C^{5'A}-H); 3,94-3,97 (m, 1H, C^{5'B}-H); 4,18-4,19 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,56-4,60 (m, 1H, C^{5'}-OH); 4,77-4,78 (m, 1H, C^{3'}-H) 4,82 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 5,53-5,55 (m, 1H, C^{3'}-OH); 6,25-6,28 (m, 1H, C^{1'}-H); 6,41 (bs, 1H, NH); 6,87-6,90 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,22-7,28 (m, 1H, Ar-H); 7,33-7,37 (m, 1H, Ar-H); 7,73 (s, 1H, C⁸-H); 8,34 (s, 1H, C²-H)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): 157,76; 155,19; 152,65; 139,49; 129,72; 129,10; 120,62; 110,39; 98,65; 89,88; 73,74; 63,63; 55,46; 44,14; 41,04; 28,88

Příprava *N*⁶-(3-methoxybenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (5)

Reakční schéma:



Postup:

V tlakové ampuli bylo 100 mg (0,28 mmol) **12** a 36,1 μl 3-methoxybenzylaminu (0,28 mmol) v 10 ml 1-propanolu. Po přidání 118 μl TEA (3 eq.) a inertizaci proudem argonu byla ampule zahřívána v olejové lázni za míchání 5 h při 100°C. Po ukončení reakce (kontrola TLC) byla RS odpařena do sucha, byla provedena extrakce (15 ml MTBE + 3x 10 ml voda; vysušení MgSO₄), a odparek po extrakci byl rozpuštěn v 5% methanolickém roztoku NH₃ za chladu v ledové lázni a ponechán míchat 2 h. Po odstavení z ledové lázně byl roztok dále míchán 12 h při teplotě laboratoře. Po ukončení reakce byla RS odpařena a produkt **5** byl izolován sloupcovou chromatografií (MF jako u TLC).

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁N₅O₄

Molární hmotnost: 371,39 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 20%

HPLC-MS (ESI⁺): 90,4%

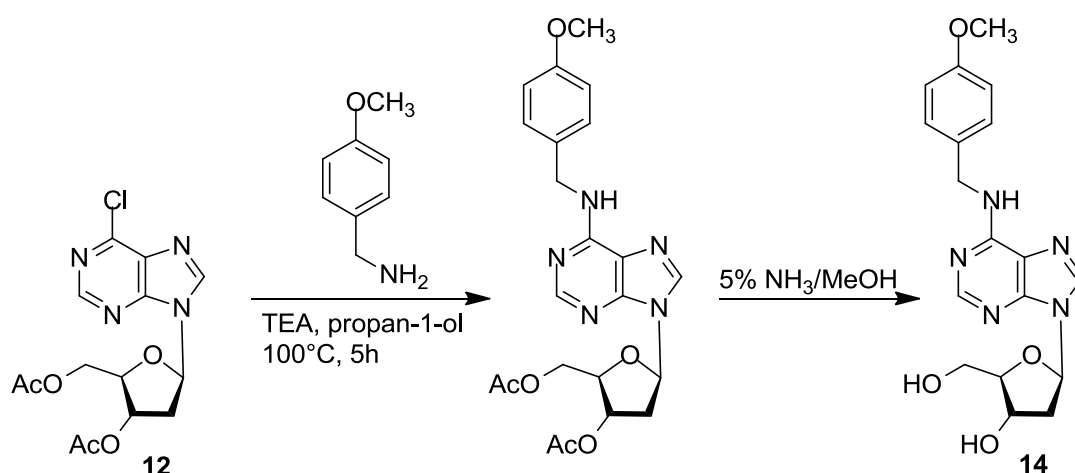
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,26-2,30 (m, 1H, C^{2'}_A-H); 3,06-3,11 (m, 1H, C^{2'}_B-H); 3,76-3,79 (m, 1H, C^{5'}_A-H); 3,77 (s, 3H, CH₃); 3,95-3,98 (m, 1H, C^{5'}_B-H); 4,20-4,21 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,56-4,60 (m, 1H, C^{5'}-OH); 4,78-4,79 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,81 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 5,53-5,55 (m, 1H, C^{3'}-OH); 6,27-6,30 (m, 1H, C^{1'}-H); 6,34 (bs, 1H, NH); 6,80-6,82 (m, 1H, Ar-H); 6,90-6,91 (m, 1H, Ar-H); 6,93-6,95 (m, 1H, Ar-H); 7,23-7,26 (m, 1H, Ar-H); 7,75 (s, 1H, C⁸-H); 8,35 (s, 1H, C²-H)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,23 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,65-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,45-3,48 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,58 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,84 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,35-4,37 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,62 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 6,29-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 6,72-6,74 (m, 1H, Ar-H); 6,84-6,88 (m, 2H, 2x (Ar-H)); 7,13-7,16 (m, 1H, Ar-H); 8,15 (s, 1H, C^8 -H), 8,32 (s, 1H, C^2 -H); 8,39 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): 159,98; 155,11; 152,68; 139,73; 129,89; 120,05; 113,49; 113,04; 99,56; 98,65; 89,90; 87,99; 72,55; 63,63; 63,24; 55,34; 44,15; 40,93; 28,88

Příprava N^6 -(4-methoxybenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (14)

Reakční schéma:



Postup:

Ke 100 mg **12** (0,28 mmol) v 10 ml 1-propanolu v tlakové ampuli byl přidán 4-methoxybenzylamin (36,8 μl , 0,28 mmol), TEA (118 μl , 3 eq.), RS byla inertizována proudem dusíku (může být i argon) a míchána 5h při 100°C v olejové lázni. Po odpaření rozpouštědla byla provedena extrakce (15 ml MTBE + 3x10 ml vody, vysušení MgSO_4) a odparek organické fáze po extrakci byl rozpuštěn v 10 ml 5% methanolickeho roztoku NH_3 a míchán za chlazení v ledové lázni 2h a poté za laboratorní teploty 12h. Po odpaření rozpouštědla byl žlutohnědý odparek purifikován sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze jako pro TLC.

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$

Molární hmotnost: 371,39 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Výtěžek: 9%

HPLC-MS (ESI^+): 94,4%

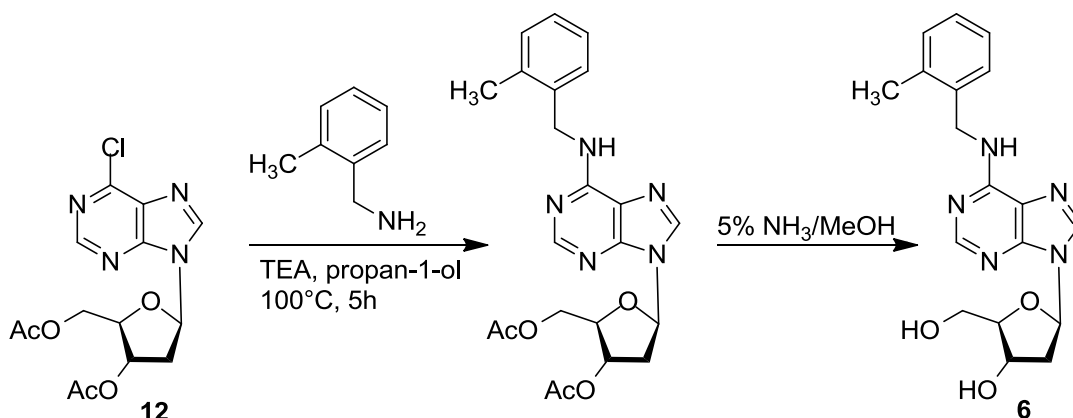
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 2,24-2,28 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 3,04-3,09 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,75-3,78 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,78 (s, 3H, CH_3); 3,94-3,97 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 4,19-4,20 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,74-4,79 (m, 3H, $\text{C}^{3'}$ -H + CH_2 -benzylu); 6,24-6,27 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 6,36 (bs, 1H, NH); 6,84-6,87 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,26-7,29 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,71 (s, 1H, C^8 -H); 8,34 (s, 1H, C^2 -H)

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 2,19-2,23 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,65-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,45-3,48 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,59 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,81-3,85 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,35-4,37 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,57 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,27 (bs, 1H, OH); 6,29-6,31 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 6,78-6,81 (m, 2H, 2x (Ar-H)); 7,21-7,24 (m, 2H, 2x (Ar-H)); 8,15 (s, 1H, C^8 -H); 8,31 (s, 1H, C^2 -H); 8,33 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): 159,20; 155,01; 152,67; 139,65; 130,19; 128,28; 114,20; 89,87; 87,65; 73,64; 63,61; 55,40; 44,11; 40,92; 28,88

Příprava N^6 -(2-methylbenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (6)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): **12** (100 mg; 0,28 mmol), 2-methylbenzylamin (35 μl ; 0,28 mmol), TEA (118 μl ; 3 eq.), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 10 ml 5% methanolického roztoku NH_3

purifikace: sloupcová chromatografie: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3$

Molární hmotnost: 355,39 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Výtěžek: 25%

HPLC-MS (ESI⁺): 95,2%

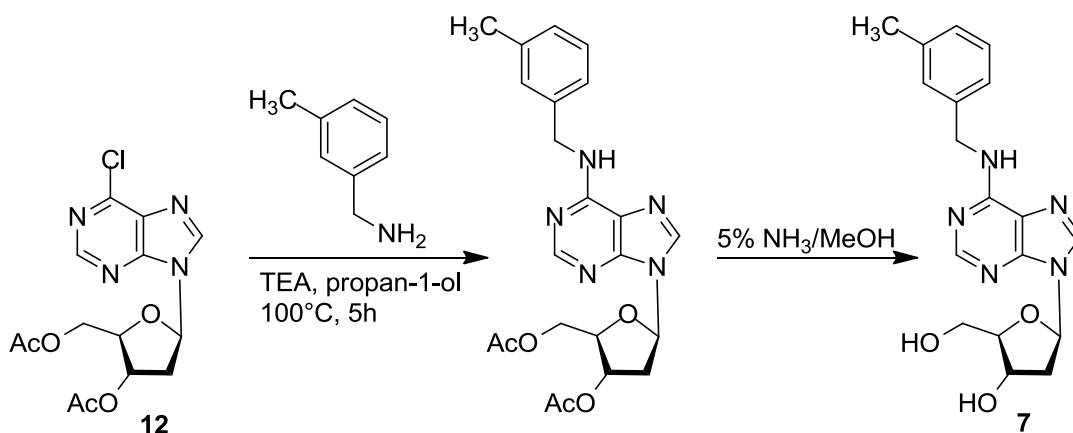
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,25-2,29 (m, 1H, C^{2'}A-H); 2,35 (s, 3H, CH₃); 3,05-3,10 (m, 1H, C^{2'}B-H); 3,76-3,79 (m, 1H, C^{5'}A-H); 3,95-3,99 (m, 1H, C^{5'}B-H); 4,18-4,20 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,56-4,59 (m, 1H, C^{5'}-OH); 4,77-4,83 (m, 3H, C^{3'}-H + CH₂-benzylu); 5,53-5,55 (m, 1H, C^{3'}-OH); 6,23 (bs, 1H, NH); 6,26-6,29 (m, 1H, C^{1'}-H); 7,15-7,23 (m, 3H, 3x(Ar-H)); 7,29-7,31 (m, 1H, Ar-H); 7,73 (s, 1H, C⁸-H); 8,36 (s, 1H, C²-H)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 2,19-2,24 (m, 1H, C^{2'}A-H); 2,29 (s, 3H, CH₃); 2,66-2,72 (m, 1H, C^{2'}B-H); 3,48-3,49 (m, 1H, C^{5'}A-H); 3,56-3,57 (m, 1H, C^{5'}B-H); 3,82-3,85 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,03-4,07 (m, 1H, C^{5'}-OH); 4,35-4,38 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,62 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 6,29-6,34 (m, 1H, C^{1'}-H); 7,02-7,08 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,10-7,12 (m, 1H, Ar-H); 7,14-7,15 (m, 1H, Ar-H); 8,14 (s, 1H, C⁸); 8,30 (bs, 1H, NH); 8,31 (s, 1H, C²)

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): 155,00; 152,70; 139,64; 136,68; 135,75; 130,67; 128,59; 128,00; 126,33; 99,54; 98,64; 73,68; 63,22; 42,51; 40, 93; 28,88; 19,17

Příprava N⁶-(3-methylbenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (7)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): 12 (108 mg; 0,30 mmol), 3-methylbenzylamin (39 μl; 0,31 mmol), TEA (118 μl), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 10 ml 5% methanolického roztoku NH₃

purifikace: sloupcová chromatografie: CHCl₃:MeOH (9:1)

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁N₅O₃

Molární hmotnost: 355,39 g/mol

TLC mobilní fáze: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1)

Výtěžek: 28%

HPLC-MS (ESI^+): 98%

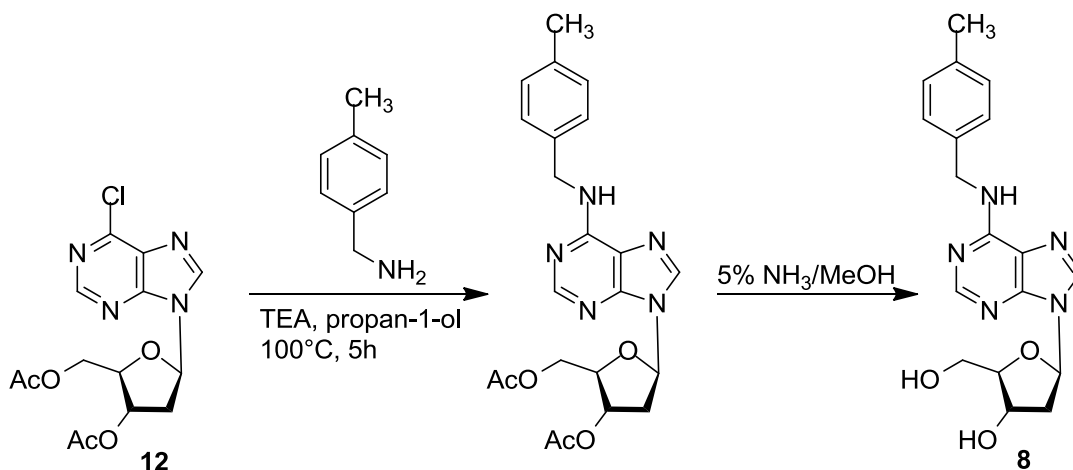
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 2,27-2,31 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,32 (s, 3H, CH_3); 3,06-3,12 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,76-3,80 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,95-3,99 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 4,20-4,21 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,57-4,60 (m, 1H, $\text{C}^{5'}$ -OH); 4,77-4,81 (m, 3H, $\text{C}^{3'}$ -H + CH_2 -benzylu); 5,54-5,55 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -OH); 6,24 (bs, 1H, NH); 6,28-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 7,07-7,11 (m, 1H, Ar-H); 7,15-7,17 (m, 2H, 2x (Ar-H)); 7,20-7,23 (m, 1H, Ar-H); 7,76 (s, 1H, C^8 -H); 8,35 (s, 1H, C^2 -H)

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): 2,21 (s, 3H, CH_3); 2,22-2,25 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,66-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,45-3,48 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,59 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,85 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,35-4,37 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,62 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,27 (bs, 1H, OH); 6,29-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 6,96-7,0 (m, 1H, Ar-H); 7,06-7,09 (m, 2H, 2x (Ar-H)); 7,11-7,14 (m, 1H, Ar-H); 8,15 (s, 1H, C^8 -H); 8,32 (s, 1H, C^2 -H); 8,40 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): 139,73; 138,59; 137,97; 128,74; 128,50; 124,90; 99,57; 98,65; 89,89; 87,98; 87,74; 73,76; 72,59; 63,61; 44,17; 40,95; 28,88; 21,48

Příprava N^6 -(4-methylbenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (8)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): 12 (100 mg; 0,28 mmol), 4-methylbenzylamin (35,6 μl ; 0,28 mmol), TEA (118 μl), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 10 ml 5% methanolického roztoku NH_3

purifikace: sloupcová chromatografie: CHCl₃:MeOH (9:1)

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁N₅O₃

Molární hmotnost: 355,39 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

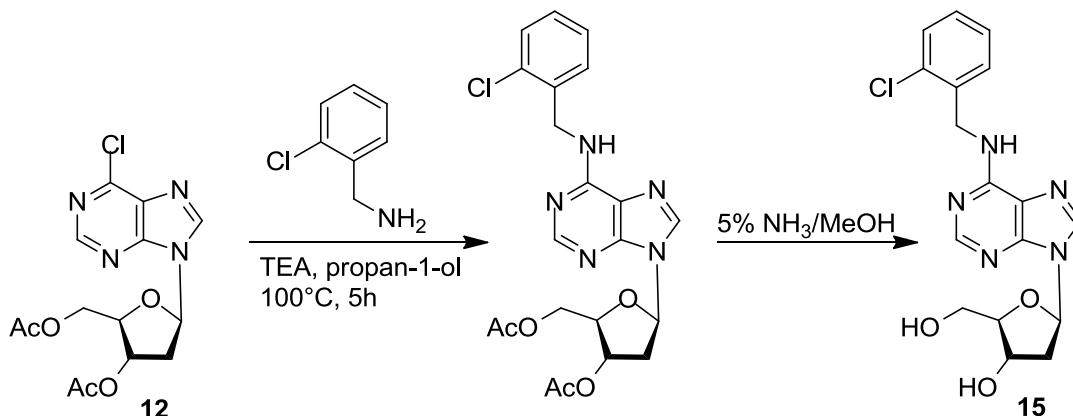
Výtěžek: 27%

HPLC-MS (ESI⁺): 90,2%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,24-2,28 (m, 1H, C^{2'}-H^A); 2,31 (s, 3H, CH₃); 3,01-3,08 (m, 1H, C^{2'}-H^B); 3,74-3,77 (m, 1H, C^{5'}-H^A); 3,94-3,97 (m, 1H, C^{5'}-H^B); 4,17-4,19 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,56-4,58 (m, 1H, C^{5'}-OH); 4,75- 4, 81 (m, 3H, C^{3'}-H + CH₂-benzylu); 5,52-5,55 (m, 1H, C^{3'}-OH); 6,23-6,27 (m, 1H, C^{1'}-H); 6,49 (bs, 1H, NH); 7,12-7,16 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,23-7,28 (m, 2H, 2x(Ar-H)); 7,71 (s, 1H, C⁸-H); 8,34 (s, 1H, C²-H)
¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): 155,09; 152,71; 139,62; 137,42; 135,10; 129,48 ; 127,86; 99,53; 98,64; 87,94; 73,56; 63,58; 63,21; 44,06; 40,92; 28,88; 21,21

Příprava N⁶-(2-chlorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (15)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): 12 (150 mg; 0,42 mmol), 2-chlorobenzylamin (51,2 μl; 0,42 mmol), TEA (177 μl; 3 eq.), 1-propanol (13 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 15 ml 5% methanolického roztoku NH₃

purifikace: sloupcová chromatografie: CHCl₃:MeOH (9:1)

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O₃

Molární hmotnost: 375,81 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 31%

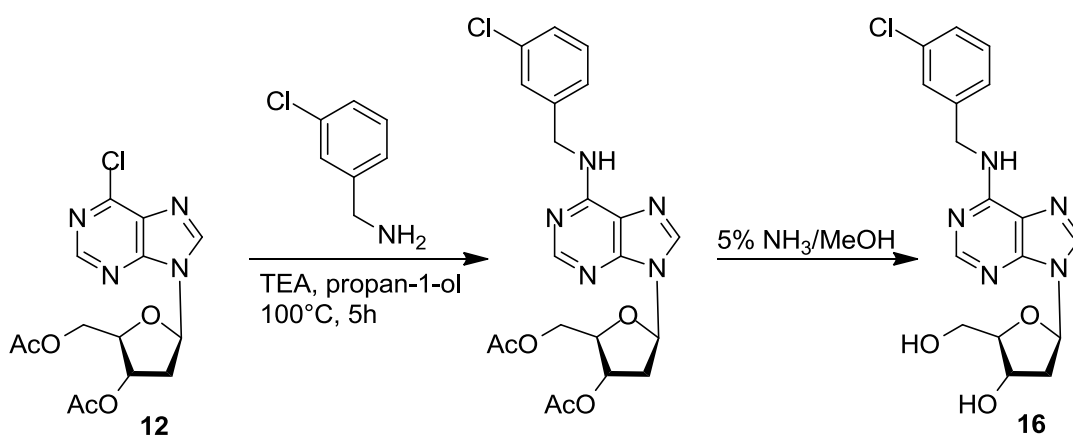
HPLC-MS (ESI⁺): 96,7%

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d⁶): 2,20-2,24 (m, 1H, C^{2'A}-H); 2,67-2,72 (m, 1H, C^{2'B}-H); 3,46-3,49 (m, 1H, C^{5'A}-H); 3,56-3,59 (m, 1H, C^{5'B}-H); 3,83-3,85 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,34-4,39 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,70 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 5,27 (bs, 1H, 3'-OH); 6,30-6,33 (t, J=15, 1H, C^{1'}-H); 7,18-7,24 (m, 3H, H^{4,5,6}-Ar); 7,39-7,40 (m, 1H, H³-Ar); 8,14 (s, 1H, C⁸-H); 8,36 (s, 1H, C²-H); 8,40 (bs, 1H, NH)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d⁶): 154,94; 152,84; 140,37; 137,21; 132,22; 129,58; 128,83; 128,40; 127,63; 120,31; 88,55; 84,51; 79,76; 79,50; 79,23; 71,47; 62,38; 41,49

Příprava N⁶-(3-chlorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (16)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): 12 (150 mg; 0,42 mmol), 3-chlorobenzylamin (51,7 μl; 0,42 mmol), TEA (177 μl; 3 eq.), 1-propanol (13 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 15 ml 5% methanolického roztoku NH₃

purifikace: preparativní TLC na skleněné desce; MF: CHCl₃:MeOH (9:1)

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O₃

Molární hmotnost: 375,81 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

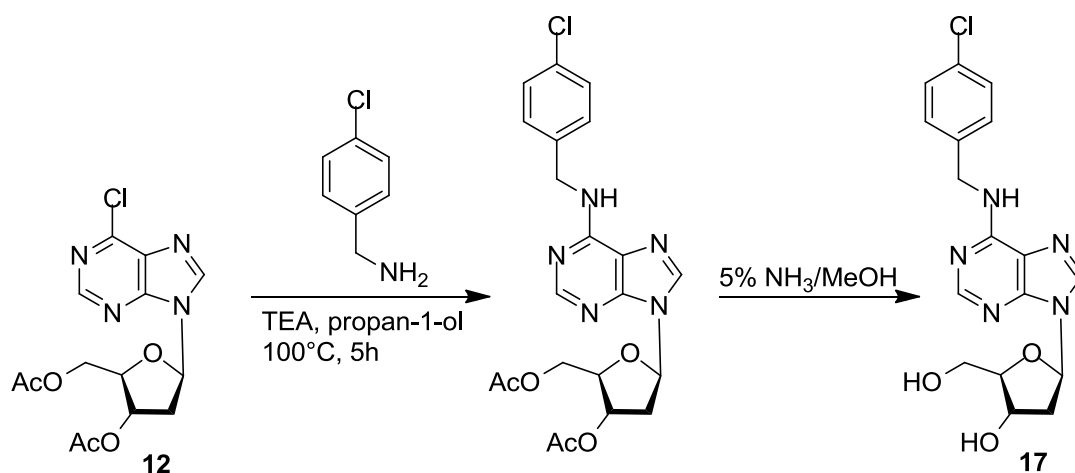
Výtěžek: 30%

HPLC-MS (ESI⁺): 94,2%

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,24 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,66-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,45-3,49 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,59 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,84 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,34-4,39 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,65 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,14-5,17 (t, $J=15$, 1H, $3'\text{-OH}$); 5,27-5,28 (d, $J=5$, 1H, $5'\text{-OH}$); 6,30-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 7,21-7,29 (m, 3H, $\text{H}^{4,5,6}\text{-Ar}$); 7,33 (s, 1H, $\text{H}^2\text{-Ar}$); 8,16 (s, 1H, $\text{C}^8\text{-H}$); 8,34 (s, 1H, $\text{C}^2\text{-H}$); 8,45 (bs, 1H, NH)
 ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 154,81; 152,85; 143,20; 140,28; 133,39; 130,67; 127,40; 127,10; 126,33; 88,54; 84,49; 71,47; 62,38; 42,91

Příprava N^6 -(4-chlorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (17)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): **12** (120 mg; 0,34 mmol), 4-chlorobenzylamin (41,2 μl ; 0,34 mmol), TEA (142 μl ; 3 eq.), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 12 ml 5% methanolického roztoku NH_3

purifikace: preparativní TLC na skleněné desce; MF: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_3$

Molární hmotnost: 375,81 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Výtěžek: 29%

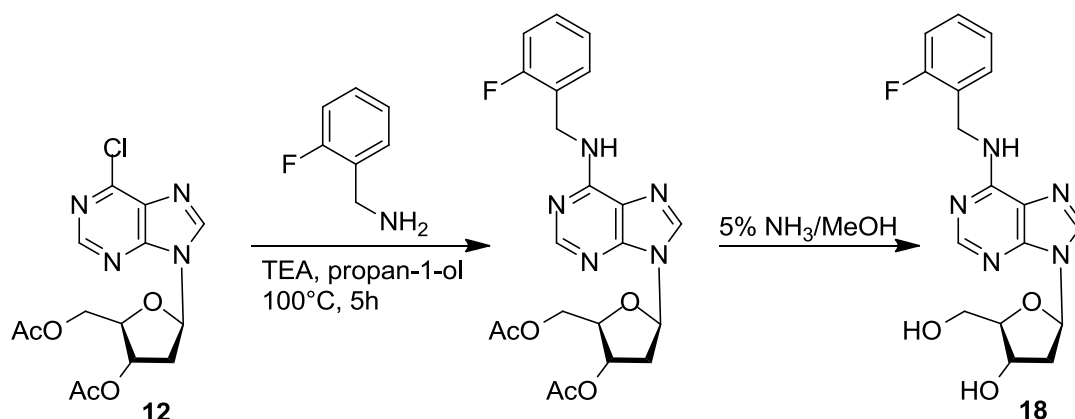
HPLC-MS (ESI^+): 99,5%

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 154,86; 152,84; 140,21; 139,61; 131,64; 129,50; 128,68; 88,53; 84,49; 71,47; 62,38; 42,76

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,23 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,66-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,46-3,49 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,58 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,84 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,34-4,38 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,63 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,15-5,17 (t, $J=10$, 1H, $3'-\text{OH}$); 5,27-5,28 (d, $J=5$, 1H, $5'-\text{OH}$); 6,29-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 7,26-7,33 (m, 4H, Ar-H); 8,15 (s, 1H, C^8 -H); 8,32 (s, 1H, C^2 -H); 8,43 (bs, 1H, NH)

Příprava N^6 -(2-fluorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (18)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): **12** (107 mg; 0,30 mmol), 2-fluorobenzylamin (34,5 μl ; 0,30 mmol), TEA (126 μl ; 3 eq.), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 10 ml 5% methanolického roztoku NH_3

purifikace: preparativní TLC na skleněné desce; MF: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_3$

Molární hmotnost: 359,35 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Výtěžek: 44%

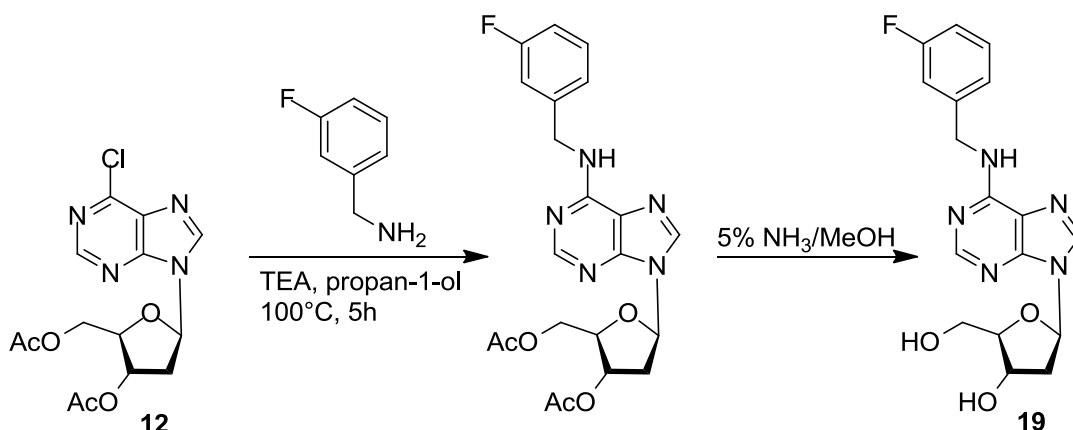
HPLC-MS (ESI^+): 98,2%

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,24 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,66-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,44-3,49 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,59 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,84 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,34-4,38 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,70 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,14-5,16 (t, $J=10$, 1H, $3'-\text{OH}$); 5,26-5,27 (d, $J=5$, 1H, $5'-\text{OH}$); 6,29-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 7,04-7,07 (m, 1H, H^3 -Ar); 7,10-7,14 (m, 1H, H^5 -Ar); 7,20-7,23 (m, 1H, H^4 -Ar); 7,24-7,27 (m, 1H, H^6 -Ar); 8,15 (s, 1H, C^8 -H); 8,34 (s, 1H, C^2 -H); 8,37 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 161,47; 159,54; 152,85; 140,27; 129,36; 129,04; 124,75; 115,59; 115,42; 88,53; 84,48; 71,47; 62,38

Příprava N^6 -(3-fluorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (19)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): **12** (123 mg; 0,35 mmol), 3-fluorobenzylamin (39,6 μl ; 0,35 mmol), TEA (145 μl ; 3 eq.), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 12 ml 5% methanolického roztoku NH_3

purifikace: preparativní TLC na skleněné desce; MF: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_3$

Molární hmotnost: 359,35 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl_3 :MeOH (9:1)

Výtěžek: 34%

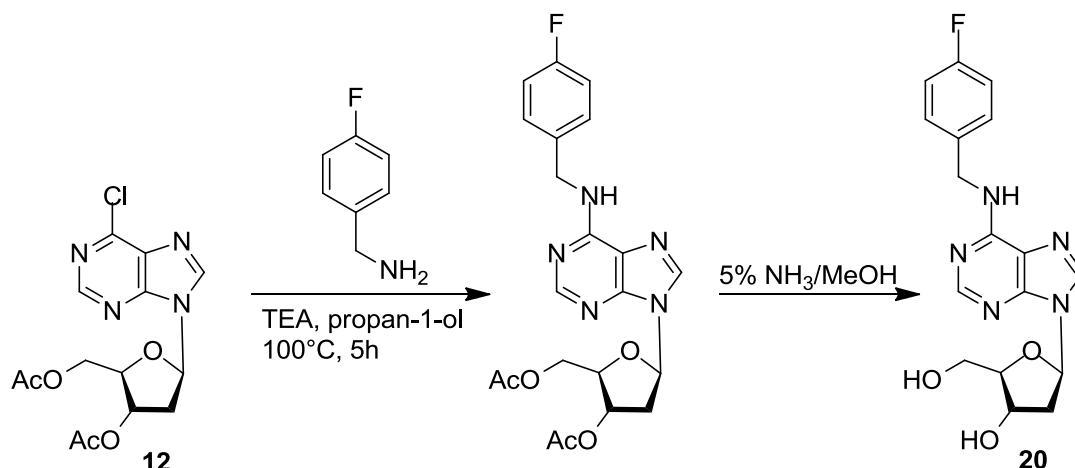
HPLC-MS (ESI^+): 96,6%

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,24 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{A}}$ -H); 2,66-2,71 (m, 1H, $\text{C}^{2'\text{B}}$ -H); 3,45-3,49 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{A}}$ -H); 3,55-3,59 (m, 1H, $\text{C}^{5'\text{B}}$ -H); 3,82-3,84 (m, 1H, $\text{C}^{4'}$ -H); 4,35-4,38 (m, 1H, $\text{C}^{3'}$ -H); 4,66 (bs, 2H, CH_2 -benzylu); 5,14-5,16 (t, $J=10$, 1H, $3'\text{-OH}$); 5,26-5,27 (d, $J=5$, 1H, $5'\text{-OH}$); 6,29-6,32 (m, 1H, $\text{C}^{1'}$ -H); 6,97-7,01 (m, 1H, Ar-H^2); 7,07-7,09 (d, $J=10$, 1H, Ar-H^6); 7,11-7,13 (d, $J=10$, 1H, Ar-H^4); 7,26-7,31 (m, 1H, Ar-H^5); 8,16 (s, 1H, C^8 -H); 8,33 (s, 1H, C^2 -H); 8,43 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 163,67; 161,73; 152,85; 148,87; 140,25; 130,72; 130,66; 123,61; 88,53; 84,49; 71,47; 62,38; 42,94

Příprava N^6 -(4-fluorobenzylamino)-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (20)

Reakční schéma:



Postup:

Postup je analogický k postupu přípravy látek 4, 5, 13, 14.

tlaková ampule (inert. atm.): 12 (103 mg; 0,29 mmol), 3-fluorobenzylamin (33,2 μl ; 0,29 mmol), TEA (120 μl ; 3 eq.), 1-propanol (10 ml), 5h, 100°C

extrakce: 15 ml MTBE + 3x 10 ml voda

deprotekce: 10 ml 5% methanolického roztoku NH₃

purifikace: preparativní TLC na skleněné desce; MF: CHCl₃:MeOH (9:1)

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈FN₅O₃

Molární hmotnost: 359,35 g/mol

TLC mobilní fáze: CHCl₃:MeOH (9:1)

Výtěžek: 23%

HPLC-MS (ESI⁺): 93,1%

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 2,19-2,23 (m, 1H, C^{2'A}-H); 2,65-2,71 (m, 1H, C^{2'B}-H); 3,44-3,49 (m, 1H, C^{5'A}-H); 3,55-3,59 (m, 1H, C^{5'B}-H); 3,82-3,84 (m, 1H, C^{4'}-H); 4,34-4,38 (m, 1H, C^{3'}-H); 4,62 (bs, 2H, CH₂-benzylu); 5,15-5,17 (t, J=10, 1H, 3'-OH); 5,26-5,27 (d, J=5, 1H, 5'-OH); 6,29-6,32 (m, 1H, C^{1'}-H); 7,04-7,08 (m, 2H, *m*-Ar-H); 7,30-7,33 (m, 2H, *o*-Ar-H); 8,15 (s, 1H, C⁸-H); 8,32 (s, 1H, C²-H); 8,40 (bs, 1H, NH)

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 162,57; 160,64; 152,85; 140,18; 129,65; 129,58; 115,51; 115,35; 100,00; 88,53; 84,49; 71,47; 70,30; 62,39; 42,71

5.2 Výsledky studia biologické aktivity

Cytokininová aktivita

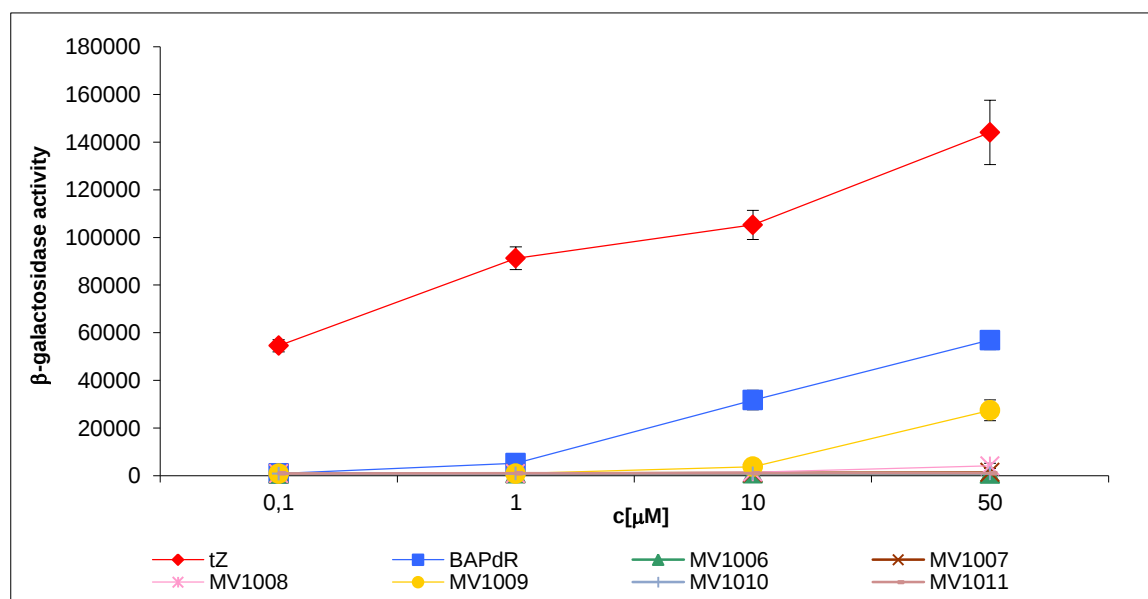
U všech nově připravených derivátů (kromě derivátu **3** z důvodu malého množství látky) byla testována **cytokininová aktivita, konkrétně AHK4 receptorové testy**. Některé z testovaných látek slabě aktivují cytokininový receptor AHK4, nejvíce látka BAPdR (39 %), dále pak MV1009 (19 %) a MV1014 (14 %). Ostatní látky aktivují již velice slabě (≤ 10 %), nebo vůbec.

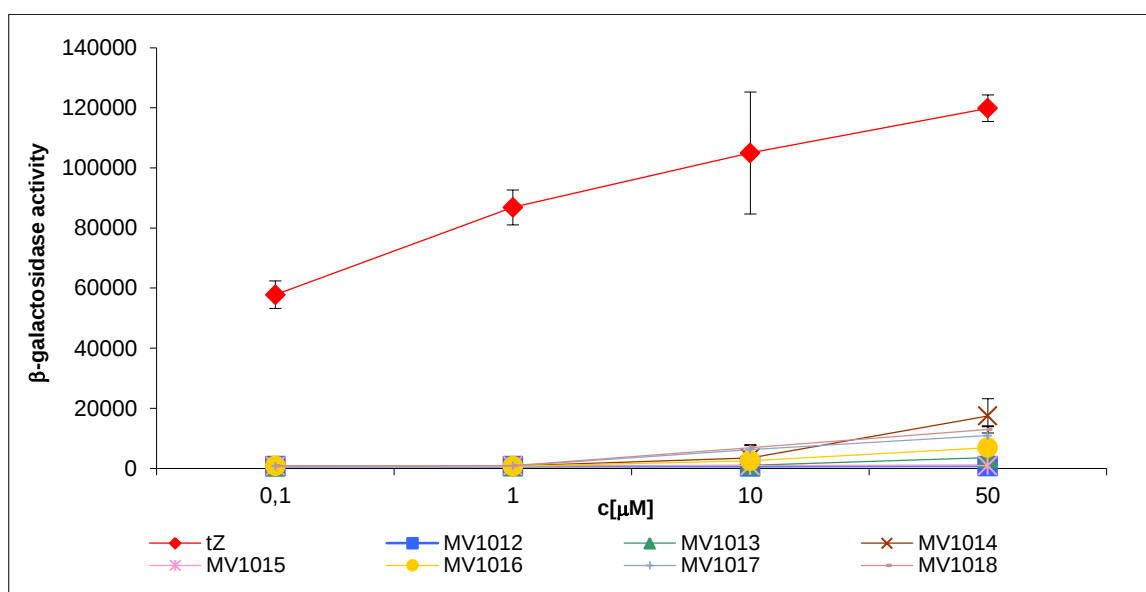
Testy byly provedeny na pracovišti CRH – Oddělení biologické chemie a genetiky, objekt H1, Šlechtitelů 27, Olomouc a poděkování za ně náleží zejména Mgr. Zuzaně Mičkové.

Tabulka 7: Seznam testovaných látek a vysvětlení, který kód v grafu náleží jakému derivátu

BAPdR = 2	MV1012 = 14
MV1006 = 4	MV1013 = 15
MV1007 = 8	MV1014 = 16
MV1008 = 7	MV1015 = 17
MV1009 = 6	MV1016 = 18
MV1010 = 13	MV1017 = 19
MV1011 = 5	MV1018 = 20

Grafy 1 a 2: Grafické znázornění výsledků testování cytokininové aktivity nově připravených sloučenin





Protinádorová aktivita

Kromě testování cytokininové aktivity bylo provedeno také testování antiproliferativní aktivity nových sloučenin na **nádorových buněčných liniích K562 a MCF7**. Těmito testy byly podrobeny všechny nové sloučeniny (včetně **3** a **2** (BaPdR)), nicméně pro všechny byla výsledná hodnota IC_{50} větší než 100 μ M. Potenciál těchto 2'-deoxy-9-(β)-D-nukleosidů jako protinádorových léčiv je tímto považován za negativní.

Testy na nádorových liniích byly provedeny na pracovišti CRH - Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. a zde moc děkuji zejména Mgr. Evě Řezníčkové.

6. Závěr

Tato diplomová práce obsahuje v rešeršní části základní informace o cytokininových derivátech a jejich cytokininové i protinádorové aktivitě. Popisuje protinádorová nukleosidová analoga a věnuje pozornost nukleosidovým antivirotikům i syntetickým přístupům k dosažení derivátů nukleosidů. Experimentální část popisuje zejména úspěšnou syntetickou cestu vedoucí ke 14-ti novým N^6 -substituovaným derivátům 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurinu (2'-deoxyadenosinu), u nichž byla testována cytokininová a protinádorová aktivita. V porovnání s aktivním cytokininem *trans*-zeatinem vykazovaly nejvyšší cytokininovou aktivitu deriváty **2** a **6** a **17**.

Derivát **2** je znám pro své antivirotické účinky a jeho 2'-hydroxy derivát N^6 -benzylamino-9-(β)-D-ribofuranosylpurin vykazuje, jak je popsáno v kapitole Cytokininy, zajímavé antiproliferativní účinky. V této práci je popsána také cytokininová aktivita derivátu **2**.

Připravené látky jsou strukturně velmi podobné s antivirotický účinným derivátem **2**, který ovšem nevykazuje protinádorovou aktivitu. Ani všech 14 nových derivátů (**3-8**, **13-20**) nevykazuje protinádorové účinky.

V budoucnu je dále nutno provést také testy osvětlující jejich vlastnosti vůči virům.

7. Seznam zkratek

3TC	lamivudin
5-FU	5-fluorouracil
5'-NT	5'-nukleosidáza
AD	adenosindeamináza
ADA	adenosindeamináza
AHK	histidin-kinázový receptor u <i>Arabidopsis thaliana</i>
ALL	akutní lymfatická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ANPs	acyklické nukleosidfosfonáty
Ara-C	cytarabin
Ara-G	9-(β)-D-arabinofuranosylguanin
ATP	adenosin trifosfát
B16	myší buňky kožního melanomu
BAP, BA	N^6 -benzylaminopurin
BAR	N^6 -benzylaminopurin-9- β -D- ribosid
BARDP	N^6 -benzylaminopurin-9- β -D-ribosid difosfát
BARMP	N^6 -benzylaminopurin-9- β -D-ribosid monofosfát
BARTP	N^6 -benzylaminopurin-9- β -D-ribosid trofosfát
BJ	normální lidské fibroblastické buňky
BOP	Castrovo činidlo, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát
BPNP	bis(p-nitrofenyl)fosfát
BSA	bis(trimethylsilyl)acetamid
BVaraU	sorivudin
BVDU	brivudin
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CDD	cytidin deamináza
CEM	buňky T-lymfoblastické leukémie
CLL	chronická lymfatická leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CNDAC	(1-(2-kyano-2'-deoxy- β -D-arabino-pentofuranosyl) cytosin

CNPs	cyklické nukleosidfosfonáty
CNTs	koncentrační nukleosidové transportní proteiny
d4C	2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidin
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCF	pentostatin
dCK	deoxycytidinkináza
ddNs	2',3'-dideoxynukleosidy
dFdC	gemcitabin
dGK	deoxyguanosinkináza
DIAD	diisopropyl-azodikarboxylát
DIPEA	diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
dNDPs	5'-deoxynukleosid difosfáty
DOT	dioxolanthymín
DPD	dihydropyrimidin dehydrogenáza
EFdA	4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosin
ENTs	ekvilibrativní nukleosidové transportní proteiny
FA	fludarabin
FLG	3'-fluoro-2',3'-dideoxyguanosin
FLT	3'-fluoro-2',3'-dideoxythymidin
FTC	emtricitabin
G-361	lidské buňky maligního melanomu
hCNTs	lidské koncentrační nukleosidové transportní proteiny
HELA	nádorové linie lidských epiteliálních buněk izolovaných roku 1951 z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacks
hENTs	lidské ekvilibrativní nukleosidové transportní proteiny
HKs	histidin-kinázové receptory
HL-60	lidské buňky promyelocytické leukémie
HMDS	hexamethyldisilazan
HMPA	hexamethylfosforamid
HOS	lidské buňky osteosarkomu
HPs	histidin-fosfotransferové proteiny
iP	isopentenyladenin

iPA	<i>N</i> -(Δ^2 -isopentenyl)adenosin
K	kinetin
K-562	lidské nádorové buňky leukémie červených krvinek
KR	kinetin ribosid
MCF-7	nádorové buňky rakoviny prsu izolované roku 1970 z 69 leté bělošské ženy
MF	mobilní fáze
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
mT	<i>meta</i> -topolin
MTBE	methyl- <i>tert</i> -butylether
M-VAC	methotrexát, vinblastin, doxorubicin a cis-platina
NBMPR	nitrobenzylmerkaptopurin ribonukleosid
NBS	N-bromosukcinimid
NDPK	nukleosiddifosfátkináza
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NIH-3T3	myši embryonické fibroblastické buňky
NNRTIs	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NRTIs	nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NTs	nukleosidové transportní proteiny
O-DAPy	6-((2-fosfonylmethoxy)alkoxy)-2,4-diaminopyrimidiny
OF	organická fáze
oT	<i>ortho</i> -topolin
PMEG	9-(2-fosfonylmethoxyethyl)guanin
PNAs	purinová nukleosidová analoga
PNP	purinnukleosidfosforyláza
pT	<i>para</i> -topolin
RPMI-8226	lidské buňky mnohočetného myelomu
RRs	„response regulators“, regulátory odpovědi
RVO	rotační vakuová odparka
SAH	S-adenosylhomocystein (hydroláza)
T-araC	thiarabin
TAS-102	trifluridin-tipiracil
TDF	tenofovir disoproxil fumarát

TFT	trifluridin
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TMS-Cl	trimethylsilylchlorid
TMSOTf	trimethylsilyl trifluoromethansulfonát
TOPCAT	2-thiopyridylkarbonát
TPáza	thymidinfosforyláza
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
UFT	kombinace uracilu a ftorafuru
VZV	varicella-zoster virus

8. Seznam použité literatury

1. Breasted, J. H. *University of Chicago Press* **1930**. ISBN 0-918986-73-7
2. Papac, R. J. *Yale J Biol Med* **2001**, 74, 391–8.
3. DeVita, V. T. *N Engl J Med* **1978**, 298, 907–10.
4. DeVita, V. T.; Chu, E. *Cancer Res* **2008**, 68, 8643–8653.
5. Goldin, A.; Schepartz, S. A.; Venditti, J. M.; DeVita, V. T. *Acad Press* **1979**, p. 165–245.
6. Hirschberg, E. *Cancer Res* **1963**, 23, 521–980.
7. Shear, M. J.; Hartwell, J. L.; Peters, V. B.; et al. *Am Assoc Adv Sci Pub* **1947**, p. 236–84.
8. Zubrod, C. G.; Schepartz, S.; Leiter, J.; Endicott, J. M.; Carrese, L. M.; Baker, C. G. *Cancer Chemother Rep* 1966, 50, 349–540.
9. Zubrod, C. G.; Schepartz, S. A.; Carter, S. K. *Natl Cancer Inst Monogr* **1977**, 45, 7–11.
10. Boyland, E. *Biochem J* **1938**, 32, 1207–13.
11. Yoshida, T. *Gann* **1949**, 40, 1–20.
12. Beatson, G. T. *Lancet* **1896**, 2, 104–7; 162–165.
13. Huggins, C.; Hodges, C. V. *Cancer Res* **1941**, 1, 293–7.
14. Hitchings, G. H.; Elion, G. B. *Ann. NY Acad Sci* **1954**, 60, 195–9.
15. Elion, G. B.; Singer, S.; Hitchings, G. H. *J Biol Chem* **1954**, 208, 477–88.
16. Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danenberg, P.; et al. *Nature* **1957**, 179, 663–6.
17. Chen, C. M. *Physiol Plant* **1997**, 101(4), 665–673.
18. Skoog, F., Strong, F. M., Miller, C. O. *Cytokinins. Science* **1965**, 148, 532–533.
19. Mok, M. C. *Boca Raton, FL: CRC Press* **1994**, pp. 155–166.
20. Miller, C. O.; Skoog, F.; Von Saltza, M. H.; Strong, M. *J Am Chem Soc* **1955**, 77(5), 1392.
21. Tanimoto, S.; Harada, H. *Plant Cell Physiol* 1982, 23(8), 1371–1376.
22. Fajkus, J.; Fulnečková, J.; Hulánová, M.; Berková, K.; Říha, K.; Matyášek, R. *Mol Gen Genet* **1998**, 260 (5), 470–474.
23. Spíchal, L.; Rakova, N.; Riefler, M.; Mizuno, T.; Romanov, G. A.; Strnad, M.; Schmölling, T. *Plant Cell Physiol* **2004**, 45, 1299–1305.
24. Sakakibara, H. *Annu. Rev. Plant Biol* **2006**, 57, 431–449.
25. Barciszewski, J.; Massino, F.; Clark, B. F. C. *Int J Bio Macromol* **2007**, 40, 182–192.
26. Kudo, T.; Makita, N.; Kojima, M.; Tokunaga, H.; Sakakibara, H. *Plant Physiol* **2012**, 160, 319–331.
27. Minorsky, P. V. *Plant Physiol* **2003**, 132, 1135–1136.
28. Yonova, P. *Gen Appl Plant Physiol* **2010**, 36, 124–147.
29. Faust, J. R.; Dice, J. F. *J Biol Chem* **1991**, 266(15), 9961–9970.
30. Spinola, M.; Galvan, A.; Pignatiello, C.; Conti, B.; Pastorino, U.; Nicander, B.; Paroni, R.; Dragani, T. A. *Oncogene* **2005**, 24, 5502–5509.
31. Schaller, G. E.; Shiu, S.; Armitage, J. P. *Curr Biol* **2011**, 21, 320–330.
32. Jeon, J.; Kim, J. *Plant Physiol* **2013**, 161, 408–424.
33. Laub, M. T.; Goulian, M. *Annu Rev Genet* **2007**, 41, 121–145.
34. Kieber, J. J.; Schaller, G. E. *Plant Physiol* **2010**, 154, 487–492.
35. Laub, M. T.; Goulian, M. *Annu Rev Genet* **2007**, 41, 121–145.
36. Hwang, I.; Sheen, J.; Müller, B. *Annu Rev Plant Biol* **2012**, 63, 353–380.
37. Higuchi, M.; Pischke, M. S.; Mähönen, A. P.; Miyawaki, K.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Shinozaki, K.; Kato, T.; Tabata, S. *Proc Natl Acad Sci* **2004**, 101, 8821–8826.
38. Shi, X.; Rashotte, A. M. *Plant Cell Rep* **2012**, 31, 789–799.
39. Punwani, J. A.; Hutchison, C. E.; Schaller, G. E.; Kieber, J. J. *Plant J* **2010**, 62, 473–482.
40. Hutchison, C. E.; Li, J.; Argueso, C.; Gonzalez, M.; Lee, E.; Lewis, M. W.; Maxwell, B. B.; Perdue, T. D.; Schaller, G. E.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R.; Kieber, J. J. *Plant C* **2006**, 18, 3073–3087.
41. Grefen, C.; Harter, K. *Planta* **2004**, 219, 733–742.
42. Mizuno, T. *Curr Op Plant Biol* **2004**, 7, 1–7.

43. To, J. P. C.; Derue`re, J.; Maxwell, B. B.; Morris, V. F.; Hutchison, C. E.; Ferreira, F. J.; Schaller, G. E.; Kieber, J. J. *Plant C* **2007**, 19, 3901–3914.
44. Argyros, R. D.; Mathews, D. E.; Chiang, Y.; Palmer, C. M.; Thibault, D. M.; Etheridge, N.; Argyros, D. A.; Mason, M. G.; Kieber, J. J.; Schallera, G. E. *Plant C* **2008**, 20, 2102–2116.
45. Rashotte, A. M.; Mason, M. G.; Hutchison, C. E.; Ferreira, F. J.; Schaller, G. E.; Kieber, J. J. *PNAS* **2006**, 103, 11081–11085.
46. Kieber Lab at UNC. Cytokinin signaling <http://kieber.weebly.com/cytokinin-signaling.html>.
47. Kunikowska, A.; Byczkowska, A.; Kaźmierczak, A. *Protoplasma* **2013**, 250, 851–861.
48. Carimi, F.; Zottini, M.; Formentin, E.; Terzi, M.; Lo Schavio, F. *Planta* **2003**, 216, 413–421.
49. Collazo, C.; Chacón, O.; Borrás, O. *Biotechnol Apl* **2006**, 23, 1–10.
50. van Doorn, W. G. *J Exp Bot* **2011**, 62 (14), 4749–4761.
51. Vescovi, M.; Riefler, M.; Gessuti, M.; Novák, O.; Schmülling, T.; Lo Schiavo, F. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63(7), 2825–2832.
52. MacLeod, R. D. *Chromosoma* **1968**, 24, 177–187.
53. Berge, U.; Kristensen, P.; Rattan, S. I. S. *Ann. NY Acad Sci* **2006**, 1067, 332–336.
54. Ishii, Y.; Hori, Y.; Sakai, S.; Honma, Y. *Cell Growth Differ* **2002**, 13, 19–26.
55. Carimi, F.; Terzi, M.; De Michele, R.; Zottini, M.; Lo Schiavo, F. *Plant Sci* **2004**, 166, 963–969.
56. van Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E. F. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed.; George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G.-J. et al. (eds.) Springer: The Netherlands, 2008, pp 205–226.
57. Werbrouck, S. P. O.; Strnad, M.; Van Onckelen, H. A.; Debergh, P. C. *Physiol Plant* **1996**, 98, 291.
58. Kamínek, M.; Vaněk, T.; Motyka, V. J. *Plant Growth Regul* **1987**, 6, 113.
59. Holub, J.; Hanuš, J.; Hanke, D. E.; Strnad, M. *Plant Growth Regul* **1998**, 26, 109.
60. Doležal, K. et al. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 875–884.
61. Berge, U.; Kristensen, P.; Rattan, S. I.; *Ann NY Acad Sci* **2006**, 1067, 332–336.
62. Mlejnek, P. J. *Cell Biochem* **2001**, 83, 678–689.
63. Mlejnek, P.; Prochazka, S. *Planta* **2002**, 215, 158–166.
64. Voller, J.; Zatloukal, M.; Lenobel, R.; Doležal, K.; Bereš, T.; Kryštof, V.; Spíchal, L.; Niemann, P.; Džubak, P.; Hajduch, M.; Strnad, M. *Phytochemistry* **2010**, 71, 1350–1359.
65. Zatloukal, M.; Doležal, K.; Voller, J.; Spíchal, L.; Strnad, M. U.S. Patent 9,073,961 B2, Jul 7, 2015.
66. Adjei, A. A.; Takamine, F.; Yokoyama, H. et al. *J Nutr Sci Vitaminol* **1992**, 38, 221.
67. Adjei, A. A.; Matsumoto, Y.; Kina, T. et al. *Tohoku J Exp Med* **1993**, 169, 179.
68. Borea, P. A. et al. *Pharmacol Rev* **2015**, 67, 74–102.
69. Fredholm, B. B. et al. *Pharmacol Rev* **2011**, 63, 1–34.
70. Linden, J. *Mol Pharmacol* **2005**, 67, 1385–1387.
71. Borea, P. A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Varani, K. *Trends Pharmacol Sci.* **2016**, Mar 1. pii: S0165-6147(16)00041-9. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.006.
72. Baldwin, S. A.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. *Molecular Medicine Today* **1999**, 5, 216–224.
73. Clarke, M. L.; Mackey, J. R.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Cancer Treatment and Research* **2002**, 112, 27–47.
74. Mackey, J. R.; Jennings, L. L.; Clarke, M. L.; Santos, C. L.; Dabbagh, L.; Vsianska, M., et al. *Clinical Cancer Research* **2002**, 8, 110–116.
75. Mackey, J. R.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Drug Resistance Updates* **1998**, 1, 310–324.
76. Vickers, M. F.; Young, J. D.; Baldwin, S. A.; Cass, C. E. *Emerging Therapeutic Targets* **2000**, 4, 515–539.
77. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Lancet Oncology* **2002**, 3, 415–424.
78. Kong, W.; Engel, K.; Wang, J. *Current Drug Metabolism* **2004**, 5, 63–84.

79. Griffiths, M.; Beaumont, N.; Yao, S. Y.; Sundaram, M.; Boumah, C. E.; Davies, A., et al. *Nat Med* **1997**, 3, 89–93.
80. Griffiths, M.; Yao, S. Y.; Abidi, F.; Phillips, S. E.; Cass, C. E.; Young, J. D., et al. *Biochem J* **1997**, 328, 739–743.
81. Baldwin, S. A.; Yao, S. Y.; Hyde, R. J.; Ng, A. M.; Foppolo, S.; Barnes, K., et al. *J Biol Chem* **2005**, 280, 15880–15887.
82. Baldwin, S. A.; Beal, P. R.; Yao, S. Y.; King, A. E.; Cass, C. E.; Young, J. D. *Pflugers Archiv* **2004**, 447, 735–743.
83. Ritzel, M. W.; Yao, S. Y.; Huang, M. Y.; Elliott, J. F.; Cass, C. E.; Young, J. D. *Am J Physiol* **1997**, 272, C707–C714.
84. Ritzel, M. W.; Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Mackey, J. R.; Cass, C. E.; Young, J. D. *Molecular Membrane Biology* **1998**, 15, 203–211.
85. Ritzel, M. W. L.; Ng, A. M.; Yao, S. Y. M.; Graham, K.; Loewen, S. K.; Smith, K. M., et al. *J Biol Chem* **2001**, 276, 2914–2927.
86. Crawford, C. R.; Patel, D. H.; Naeve, C.; Belt, J. A. *Cancer Metastasis Rev* **2007**, 26, 85–110.
87. Visser, F.; Vickers, M. F.; Ng, A. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. *J Biol Chem* **2002**, 277, 395–401.
88. Visser, F.; Baldwin, S. A.; Isaac, R. E.; Young, J. D.; Cass, C. E. *J Biol Chem* **2005**, 280, 11025–11034.
89. Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Vickers, M. F.; Sundaram, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A., et al. *J Biol Chem* **2002**, 277, 24938–24948.
90. Acimovic, Y.; Coe, I. R. *Mol Biol Evol* **2002**, 19, 2199–2210.
91. Hyde, R. J.; Abidi, F.; Griffiths, M.; Yao, S. Y. M.; Sundaram, M.; Phillips, S. E. V., et al. *Drug Develop Res* **2000**, 50, 38.
92. Engel, K.; Zhou, M.; Wang, J. *J Biol Chem* **2004**, 279, 50042–50049.
93. Smith, K. M.; Slugoski, M. D.; Loewen, S. K.; Ng, A. M.; Yao, S. Y.; Chen, X. Z., et al. *J Biol Chem* **2005**, 280, 25436–25449.
94. Wang, J.; Su, S. F.; Dresser, M. J.; Schaner, M. E.; Washington, C. B.; Giacomini, K. M. *Am J Physiol* **1997**, 273, F1058–F1065.
95. Wang, J.; Schaner, M. E.; Thomassen, S.; Su, S. F.; Piquette-Miller, M.; Giacomini, K. M. *Pharm Res* **1997**, 14, 1524–1532.
96. Lang, T. T.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Mol Pharm* **2004**, 65, 925–933.
97. Mackey, J. R.; Galmarini, C. M.; Graham, K. A.; Joy, A. A.; Delmer, A.; Dabbagh, L., et al. *Blood* **2005**, 105, 767–774.
98. Pastor-Anglada, M.; Casado, F. J.; Valdes, R.; Mata, J.; Garcia-Manteiga, J.; Molina, M. *Molecular Membrane Biology* **2001**, 18, 81–85.
99. Felipe, A.; Valdes, R.; Santo, B.; Lloberas, J.; Casado, J.; Pastor-Anglada, M. *Biochem J* **1998**, 330, 997–1001.
100. Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Loewen, S. K.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. *Am J Physiol Cell Physiology* **2002**, 283, C155–C168.
101. Mackey, J. R.; Mani, R. S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J. D.; Belt, J. A., et al. *Cancer Res* **1998**, 58, 4349–4357.
102. Galmarini, C. M.; Thomas, X.; Calvo, F.; Rousselot, P.; Rabilloud, M.; El Jaffari, A., et al. *British Journal of Haematology* **2002**, 117, 860–868.
103. Clarke, M. L.; Damaraju, V. L.; Zhang, J.; Mowles, D.; Tackaberry, T.; Lang, T., et al. *Mol Pharm* **2006**, 70, 301–310.
104. Damaraju, V. L.; Damaraju, S.; Young, J. D.; Baldwin, S. A.; Mackey, J.; Sawyer, M. B., et al. *Oncogene* **2003**, 22, 7524–7536.
105. Gati, W. P.; Paterson, A. R.; Belch, A. R.; Chlumecky, V.; Larratt, L. M.; Mant, M. J., et al. *Leukemia and Lymphoma* **1998**, 32, 45–54.
106. Mackey, J. R.; Jennings, L. L.; Clarke, M. L.; Santos, C. L.; Dabbagh, L.; Vsianska, M., et al. *Clinical Cancer Res* **2002**, 8, 110–116.
107. Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Sundaram, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D. *Molecular Membrane Biology* **2001**, 18, 161–167.

108. Mackey, J. R.; Yao, S. Y.; Smith, K. M.; Karpinski, E.; Baldwin, S. A.; Cass, C. E., et al. *J Nat Cancer Inst* **1999**, 91, 1876–1881.
109. Lostao, M. P.; Mata, J. F.; Larrayoz, I. M.; Inzillo, S. M.; Casado, F. J.; Pastor-Anglada, M. *FEBS Letters* **2000**, 481, 137–140.
110. Graham, K. A.; Leithoff, J.; Coe, I. R.; Mowles, D.; Mackey, J. R.; Young, J. D., et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, 19, 415–434.
111. Mata, J. F.; Garcia-Manteiga, J. M.; Lostao, M. P.; Fernandez-Veledo, S.; Guillen-Gomez, E.; Larrayoz, I. M., et al. *Mol Pharm* **2001**, 59, 1542–1548.
112. Li, J. Y.; Boado, R. J.; Pardridge, W. M. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, 299, 735–740.
113. Gerstin, K. M.; Dresser, M. J.; Giacomini, K. M. *Am J Physiol Renal Physiology* **2002**, 283, F344–F349.
114. Lang, T. T.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Mol Pharmacol* **2004**, 65, 925–933.
115. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Leukemia* **2001**, 15, 875–890.
116. Spratlin, J.; Sangha, R.; Glubrecht, D.; Dabbagh, L.; Young, J. D.; Dumontet, C., et al. *Clinical Cancer Res* **2004**, 10, 6956–6961.
117. Lang, T. T.; Selner, M.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Mol Pharmacol* **2001**, 60, 1143–1152.
118. Tallman, M. S.; Hakimian, D.; Variakojis, D.; Koslow, D.; Sisney, G. A.; Rademaker, A. W.; Rose, E.; Kaul, K. *Blood* **1992**, 80, 2203–2209.
119. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, Ch. *Lancet Oncol* **2002**, 3, 415–24.
120. Drake, S.; Burns, R. L.; Nelson, J. A. *Chem Biol Interact* **1982**, 41, 105–15.
121. Yoshida, S.; Yamada, M.; Masaki, S.; Saneyoshi, M. *Cancer Res* **1979**, 39, 3955–58.
122. Matsumura, S.; Hoshino, T.; Weizsaecker, M.; Deen, D. F. *Cancer Treat Rep* **1983**, 67, 475–80.
123. Chessells, J. M.; Bailey, C.; Richards, S. M. *Lancet* **1995**, 345, 143–48.
124. Erb, N.; Harms, D. O.; Janka-Schaub, G. *Cancer Chemother Pharmacol* **1998**, 42, 266–72.
125. Buchner, T.; Hiddemann, W.; Berdel, W., et al. *Cancer Chemother Pharmacol* **2001**, 48 (suppl 1), S41–44.
126. Johnson, S. A. *Expert Opin Pharmacother* **2001**, 2, 929–943.
127. Robak, T.; Kasznicki, M. *Leukemia* **2002**, 16, 1015–1027.
128. Robak, T.; Lech-Maranda, E.; Korycka, A.; Robak, E. *Curr Med Chem.* **2006**, 13, 3165–3189.
129. Pettit, A. R. *Br. J. Haematol.* **2003**, 121, 692–702.
130. Robak, T. *Cancer Treat. Rev.* **2006**, 32, 365–376.
131. Pastor-Anglada, M.; Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Gil, J. *Leukemia* **2004**, 18, 385–393.
132. Robak, T. *Cancer Treat Rev* **2007**, 33, 710–728.
133. Kalinka-Warzocha, E.; Wajs, J.; Lech-Maranda, E.; Ceglarek, B.; Holowiecki, J.; Federowicz, I.; Walewski, J.; Czyz, J.; Robak, T.; Warzocha, K. *Cancer* **2008**, 113, 367–375.
134. Zinzani, P. L. *Best Pract Res Clin Haematol* **2002**, 15, 505–516.
135. Hellmann, A.; Lewandowski, K.; Zaucha, J. M.; Bieniaszewska, M.; Halaburda, K.; Robak, T. *Eur J Haematol* **1999**, 63, 35–41.
136. Johnson, S. A.; Oscier, D. G.; Leblond, V. *Blood Rev* **2002**, 16, 175–184.
137. Evens, A. M.; Gartenhaus, R. B. *Curr. Treat Options Oncol* **2004**, 5, 289–303.
138. Korycka, A.; Lech-Maranda, E.; Robak, T. *Recent Patents AntiCancer Drug Discov* **2008**, 3, 123–136.
139. Parker, W. B.; Secrist, J. A. 3rd; Waud, W. R. *Curr Opin Investig Drugs* **2004**, 5, 592–596.
140. Faderl, S.; Gandhi, V.; Keating, M. J.; Jeha, S.; Plunkett, W.; Kantarjian, H. M. *Cancer* **2005**, 103, 1985–1995.
141. Pui, C. H.; Jeha, S.; Kirkpatrick, P. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4, 369–370.
142. Roecker, A. M.; Allison, J. C.; Kisor, D. F. *Future Oncol* **2006**, 2, 441–448.
143. Prus, K. L.; Averett, D. R.; Zimmerman, T. P. *Cancer Res* **1990**, 50, 1817–1821.
144. Kisor, D. F. *Drugs Today* **2006**, 42, 455–465.
145. Balakrishnan, K.; Nimmanapalli, R.; Ravandi, F.; Keating, M. J.; Gandhi, V. *Blood* **2006**, 108, 2392–2398.

146. Korycka, A.; Błoński, J. Z.; Robak, T. *Mini Rev Med Chem* **2007**, 7, 976–983.
147. Rodriguez, C. O.; Mitchell, B. S.; Ayres, M.; Eriksson, S.; Gandhi, V. *Cancer Res* **2002**, 62, 3100–3105.
148. Robak, T.; Korycka, A.; Robak, E. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov* **2006**, 1, 23–38.
149. Beutler, E. *Lancet* **1992**, 340, 952–956.
150. Santana, V. M.; Mirro, Jr. J.; Harwood, F. C. *J Clin Oncol* **1991**, 9, 416–422.
151. Santana, V. M.; Mirro, Jr. J.; Kearns, C. *J Clin Oncol* **1992**, 10, 364–370.
152. Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Cantrell, Jr. W. R.; Stephenson, K.; Secrist, 3rd J. A.; Weitman, S. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 855–863.
153. King, K. M.; Damaraju, V. L.; Vickers, M. F., et al. *Mol Pharmacol* **2006**, 69, 346–353.
154. Majda, K.; Lubecka, K.; Kaufman-Szymczyk, A.; Fabianowska-Majewska, K. *Acta Pol Pharm* **2011**, 68, 459–466.
155. Kantarjian, H. M.; Jeha, S.; Ganhi, V.; Wess, M.; Faderl, S. *Leuk lymphoma* **2007**, 48, 1922–1930.
156. Lambe, C. U.; Averett, D. R.; Paff, M. T., et al. *Cancer Res* **1995**, 55, 3352–3356.
157. Rodriguez, C. O.; Mitchell, B. S.; Ayres, M.; Eriksson, S.; Gandhi, V. *Cancer Res* **2002**, 62, 3100–3105.
158. Kisor, D. F. *Drugs Today* **2006**, 42, 455–465.
159. Ghandi, V.; Plunkett, W. *Curr Opin Oncol* **2006**, 18, 584–590.
160. Aguayo, A.; Cortes, J. E.; Kantarjian, H. M.; Beran, M.; Gandhi, V.; Plunkett, W.; Kurtzberg, J.; Keating, M. J. *Cancer* **1999**, 85, 58–64.
161. Kurtzberg, J.; Ernst, T.; Keating, M.; Gandhi, V.; Hodge, J.; Kisor, D.; Therriault, R.; Stephens, C.; Levin, J.; Krenitsky, T.; Elion, G.; Mitchell, B. *Proc Am Soc Hematol* **1999**, 94, 2794A.
162. Martin, D. W.; Gelfand, E. W. *Annu Rev Biochem.* **1981**, 50, 845–877.
163. Kredich, N. M.; Herschfield, M. S. In *The metabolic basis of inherited disease*; Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. S., eds; McGraw-Hill: New York, 1989; 1045–75.
164. Giblett, E. R.; Ammann, A. J.; Wara, D. W.; Sandman, R.; Diamond, L. K. *Lancet* **1975**, 1, 1010–13.
165. Cohen, A.; Doyle, D.; Martin, D. W.; Ammann, A. J. *N Engl J Med* **1976**, 295, 1449–1454.
166. Siegenbeek van Heukelom, L. K.; Staal, G. E. J.; Stoop, J. W.; Zegers, B. J. M. *Clin Chim Acta* **1976**, 72, 117–24.
167. Markert, M. L. *Immunodeficiency Rev* **1991**, 3, 45–81.
168. Kazmers, I. S.; Mitchell, B. S.; DaDonna, P. E.; Wotring, I. I.; Townsend, L. B.; Kelly, W. N. *Science* **1981**, 214, 1137–1139.
169. Sircar, J. C.; Gilbertsen, R. B. *Drugs Future* **1988**, 13, 653–668.
170. Krett, N. L., et al. *Mol. Cancer Ther* **2004**, 3, 1411–1420.
171. Gandhi, V., et al. *Cancer Res* **2001**, 61, 5474–5479.
173. Frey, J. A.; Gandhi, V. *Mol Cancer Ther* **2010**, 9, 236–245.
174. ClinicalTrials.gov. 8-Chloro-Adenosine in Chronic Lymphocytic Leukemia <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00714103> (aktualizováno říjen 2015).
175. Stellrecht, C. M.; Ayres, M.; Arya, R.; Gandhi, V. *BreastCancer Res Treat* **2010**, 121, 355–364.
176. Stellrecht, C. M.; Phillip, C. J.; Cervantes-Gomez, F.; Gandhi, V. *Cancer Res* **2007**, 67, 9913–9920.
177. Yang, S. Y., et al. *Biochem Pharmacol* **2009**, 77, 433–443.
178. Gu, Y. Y., et al. *Biochem Pharmacol* **2006**, 72, 541–550.
179. Plunkett, W.; Liliemark, J. O.; Estey, E.; Keating, M. J. *Semin Oncol* **1987**, 14 (suppl 1), 159–66.
180. Galmarini, C. M.; Graham, K.; Thomas, X., et al. *Blood* **2001**, 98, 1922–26.
181. Raza, A.; Gezer, S.; Anderson, J., et al. *Exp Hematol* **1992**, 20, 1194–200.
182. Baker, W. J.; Royer, G. L. Jr.; Weiss, R. B. *J Clin Oncol* **1991**, 9, 679–93.
183. Plunkett, W.; Huang, P.; Xu, Y. Z., et al. *Semin Oncol* **1995**, 22 (suppl 11), 3–10.
184. Huang, P.; Plunkett, W. *Semin Oncol* **1995**, 22 (suppl 11), 19–25.
185. Plunkett, W.; Huang, P.; Searcy, C. E.; Gandhi, V. *Semin Oncol* **1996**, 23 (suppl 10), 3–15.

186. Rieger, J.; Durka, S.; Streffer, J., et al. *Eur J Pharmacol* **1999**, 365, 301–308.
187. Xu, Y. Z.; Plunkett, W. *Biochem Pharmacol* **1992**, 44, 1819–1827.
188. Heinemann, V.; Schulz, L.; Issels, R. D.; Plunkett, W. *Semin Oncol* **1995**, 22 (suppl 11), 11–18.
189. Gourdeau, H.; Clarke, M. L.; Ouellet, F., et al. *Proc Am Assoc Cancer Res* **2001**, 42, 423a.
190. Grove, K. L.; Guo, X.; Liu, S. H., et al. *Cancer Res* **1995**, 55, 3008–3011.
191. Vose, J. M.; Panwalkar, A.; Belanger, R.; Coiffier, B.; Baccarani, M.; Gregory, S. A.; Facon, T.; Fanin, R.; Caballero, D.; Ben-Yehuda, D.; Giles, F. *Leuk Lymphoma*. 2007, 48(1), 39–45.
192. Woessner, R. D.; Bitonti, A. J. *Drugs Future* **1999**, 24, 502–510.
193. McCarthy, J. R.; Sunkara, P. S.; Matthews, D. P.; Bitonti, A. J.; Jarvi, E. T.; Sabol, J. S.; Resvick, R. J.; Huber, E. W.; van der Donk, W. A.; Yu, G.; Stubbe, J. *ACS Symp Ser* **1996**, 639, 246–264.
194. Woessner, R. D.; Loudy, D. E.; Wallace, C. D., et al. *Oncol Res* **1997**, 9, 543–52.
195. Rodriguez, G. I.; Jones, R. E.; Orenberg, E. K.; Stoltz, M. L.; Brooks, D. J. *Clinical Cancer Res* **2002**, 8, 2828–2834.
196. Kantarjian, H., et al. *Lancet Oncol* **2012**, 13, 1096–1104.
197. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, Ch. *Nature reviews drug discovery* **2013**, Volume 12, 447–464.
198. Peters, G. J., et al. *Invest New Drugs* **2013**, 31, 1444–1457.
199. Tiwari, K. N., et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, 19, 329–340.
200. Lee, C. P., et al. *Clin Cancer Res* **2006**, 12, 2841–2848.
201. Waud, W. R.; Gilbert, K. S.; Shepherd, R. V.; Montgomery, J. A.; Secrist, J. A. *Cancer Chemother Pharmacol* **2003**, 51, 422–426.
202. Someya, H.; Waud, W. R.; Parker, W. B. *Cancer Chemother Pharmacol* **2006**, 57, 772–780.
203. Yin, M. B.; Rustum, Y. M. *Cancer Commun* **1991**; 3, 45–51.
204. Mandel, H. G. *Cancer Treat. Rep.* **1981**, 65 (suppl 3), 63–71.
205. Doroshow, N. P. *J Clin Oncol* **1992**, 10, 896–903.
206. Ishikawa, T.; Utoh, M.; Sawada, N., et al. *Biochem Pharmacol* **1998**, 55, 1091–97.
207. Van Cutsem, E.; Findlay, M.; Osterwalder, B., et al. *J Clin Oncol* **2000**, 18, 1337–45.
208. Sawada, N.; Ishikawa, T.; Fukase, Y., et al. *Clin Cancer Res* **1998**, 4, 1013–19.
209. Villalona-Calero, M. A.; Weiss, G. R.; Burris, H. A., et al. *J Clin Oncol* **1999**, 17, 1915–25.
210. Ishikawa, T.; Sekiguchi, F.; Fukase, Y., et al. *Cancer Res* **1998**, 58, 685–90.
211. Baker, S. D.; Khor, S. P.; Adjei, A. A., et al. *J. Clin Oncol* **1996**, 14, 3085–96.
212. Schilsky, R. L.; Bukowski, R.; Burris, H., et al. *Ann Oncol* **2000**, 11, 415–20.
213. Pazdur, R.; Hoff, P. M.; Medgyesy, D., et al. *Oncology (Huntingt)* **1998**, 12 (suppl 7), 48–51.
214. Sun, W.; Haller, D. *Oncology (Huntingt)* **2001**, 15 (suppl 2), 49–56.
215. Fukushima, M.; Satake, H.; Uchida, J., et al. *Int J Oncol* **1998**, 13, 693–698.
216. Miyamoto, Y.; Oki, E.; Saeki, H.; Maehara, Y.; Baba, H. *Gan To Kagaku Ryoho* **2016**, 43, 15–23.
217. Mosconi, A. M.; Crino, L.; Tonato, M. *Eur J Cancer* **1997**, 33 (suppl 1), S14–17.
218. Carles, J.; Nogue, M. *Semin Oncol* **2001**, 28 (suppl 10), 19–24.
219. Domine, M.; Casado, V.; Estevez, L. G., et al. *Semin Oncol* **2001**, 28 (suppl 10), 4–9.
220. Tester, W.; Mora, J. *Expert Opin. Investig Drugs* **2001**, 10, 1021–1032.
221. Hallek, M.; Schmitt, B.; Wilhelm, M., et al. *Br. J Haematol* **2001**, 114, 342–348.
222. Visani, G.; Tosi, P.; Zinzani, P. L., et al. *Eur. J Haematol* **1996**, 56, 308–312.
223. Gandhi, V.; Plunkett, W.; Weller, S., et al. *J Clin Oncol* **2001**, 19, 2142–2152.
224. Groschel, B.; Cinatl, J.; Perigaud, C., et al. *Antiviral Res* **2002**, 53, 143–152.
225. Li, X.; Nikadio, H. *Drug* **2009**, 69 (12), 1555–1623.
226. Chow, L.; Lai, R.; Dabbagh, L.; Belch, A.; Young, J. D.; Cass, C. E., et al. *Modern Pathology* **2005**, 18, 558–564.
227. Coleman, C. N.; Stoller, R. G.; Drake, J. C.; Chabner, B. A. *Blood* **1975**, 46, 791–803.

228. Carson, D. A.; Wasson, D. B.; Kaye, J.; Ullman, B.; Martin, D. W. Jr.; Robins, R. K.; Montgomery, J. A. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, 77, 6865–6869.
229. Heinemann, V.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Cancer Res* **1988**, 48, 4024–4031.
230. Wan, C. W.; Mak, T. W. *Cancer Res* **1978**, 38, 2768–2772.
231. Arner, E. S.; Flygar, M.; Bohman, C.; Wallstrom, B.; Eriksson, S. *Exp Cell Res* **1988**, 178, 335–342.
232. Terai, C.; Wasson, D. B.; Carrera, C. J.; Carson, D. A. *J Immunol* **1991**, 147, 4302–4306.
233. Hengstschlager, M.; Denk, C.; Wawra, E. *FEBS Lett* **1993**, 321, 237–240.
234. Verhoef, V.; Sarup, J.; Fridland, A. *Cancer Res* **1981**, 41, 4478–4483.
235. Bhalla, K.; Nayak, R.; Grant, S. *Cancer Res* **1984**, 44, 5029–5037.
236. Stegmann, A. P.; Honders, M. W.; Kester, M. G.; Landegent, J. E.; Willemze, R. *Leukemia* **1993**, 7, 1005–1011.
237. Dumontet, C.; Fabianowska-Majewska, K.; Mantincic, D.; Callet Bauchu, E.; Tigaud, I.; Gandhi, V.; Lepoivre, M.; Peters, G. J.; Rolland, M. O.; Wyczzechowska, D.; Fang, X.; Gazzo, S.; Voorn, D. A.; Vanier-Viorner, A.; MacKey, J. *Br J Haematol* **1999**, 106, 78–85.
238. Stegmann, A. P.; Honders, W. H.; Willemze, R.; Ruiz van Haperen, V. W.; Landegent, J. E. *Blood* **1995**, 85, 1188–1194.
239. Hapke, D. M.; Stegmann, A. P.; Mitchell, B. S. *Cancer Res* **1996**, 56, 2343–2347.
240. Ho, D. H. *Cancer Res* **1973**, 33, 2816–2820.
241. Spasokoukotskaja, T.; Arner, E. S.; Brosjo, O.; Gunven, P.; Juliusson, G.; Liliemark, J.; Eriksson, S. *Eur J Cancer* **1995**, 2, 202–208.
242. Kakihara, T.; Fukuda, T.; Tanaka, A.; Emura, I.; Kishi, K.; Asami, K.; Uchiyama, M. *Leuk Lymphoma* **1998**, 31, 405–409.
243. Stammer, G.; Zintl, F.; Sauerbrey, A.; Volm, M. *Anticancer Drugs* **1997**, 8, 517–521.
244. Tattersall, M. H.; Ganeshaguru, K.; Hoffbrand, A. V. *Br. J Haematol* **1974**, 27, 39–46.
245. Colly, L. P.; Peters, W. G.; Richel, D.; *Semin Oncol* **1987**, 14, 257–261.
246. Kawasaki, H.; Carrera, C. J.; Piro, L. D.; Saven, A.; Kipps, T. J.; Carson, D. A. *Blood* **1993**, 81, 597–601.
247. Albertioni, F.; Lindemalm, S.; Reichelova, V.; Pettersson, B.; Eriksson, S.; Juliusson, G.; Liliemark, J. *Clin Cancer Res* **1998**, 4, 653–658.
248. Leiby, J. M.; Snider, K. M.; Kraut, E. H.; Metz, E. N.; Malspeis, L.; Grever, M. R. *Cancer Res* **1987**, 47, 2719–2722.
250. Wang, L.; Karlsson, A.; Arner, E. S.; Eriksson, S. *J Biol Chem* **1993**, 268, 22847–22852.
251. Hentosh, P.; Tibudan, M. *Mol Pharmacol* **1997**, 51, 613–619.
252. Sjoberg, A. H.; Wang, L.; Eriksson, S. *Mol Pharmacol* **1998**, 53, 270–273.
253. Arner, E. S.; Eriksson, S. *Pharmacol Ther* **1995**, 67, 155–186.
254. Johansson, M.; Karlsson, A. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, 7258–7262.
255. Johansson, M.; Karlsson, A. *J Biol Chem* **1997**, 272, 8454–8458.
256. Wang, L.; Hellman, U.; Eriksson, S. *FEBS Lett* **1996**, 390, 39–43.
257. Wang, L.; Munch-Petersen, B.; Herrstrom Sjoberg, A.; Hellman, U.; Bergman, T.; Jornvall, H.; Eriksson, S. *FEBS Lett* **1999**, 443, 170–174.
258. Petrakis, T. G.; Ktistaki, E.; Wang, L.; Eriksson, S.; Talianidis, I. *J Biol Chem* **1999**, 274, 24726–24730.
259. Resta, R.; Yamashita, Y.; Thompson, L. F. *Immunol Rev* **1998**, 161, 95–109.
260. Pieters, R.; Thompson, L. F.; Broekema, G. J.; Huismans, D. R.; Peters, G. J.; Pals, S. T.; Horst, E.; Hahlen, K.; Veerman, A. J. *Blood* **1991**, 78, 488–492.
261. Mansson, E.; Spasokoukotskaja, T.; Sallstrom, J.; Eriksson, S.; Albertioni, F. *Cancer Res* **1999**, 59, 5956–5963.
262. Laliberte, J.; Momparler, R. L. *Cancer Res* **1994**, 54, 5401–5407.
263. Neff, T.; Blau, C. A. *Exp Hematol* **1996**, 24, 1340–1346.
264. Momparler, R. L.; Eliopoulos, N.; Bovenzi, V.; Letourneau, S.; Greenbaum, M.; Cournoyer, D. *Cancer Gene Ther* **1996**, 3, 331–338.

265. Schroder, J. K.; Kirch, C.; Flasshove, M.; Kalweit, H.; Seidelmann, M.; Hilger, R.; Seeber, S.; Schutte, J. *Leukemia* **1996**, 10, 1919–1924.
266. Steuart, C. D.; Burke, P. J. *Nat New Biol* **1971**, 233, 109–110.
267. Jahns-Streubel, G.; Reuter, C.; Auf der Landwehr, U.; Unterhalt, M.; Schleyer, E.; Wormann, B.; Buchner, T.; Hiddemann, W. *Blood* **1997**, 90, 1968–1976.
268. Schröder, J. K.; Kirch, C.; Seeber, S.; Schutte, J. *Br. J. Haematol* **1998**, 103, 1096–1103.
269. Kirch, H. C.; Schroder, J.; Hoppe, H.; Esche, H.; Seeber, S.; Schutte, J. *Exp Hematol* **1998**, 26, 421–425.
270. Chiba, P.; Tihan, T.; Szekeres, T.; Salamon, J.; Kraupp, M.; Eher, R.; Koller, U.; Knapp, W. *Leukemia* **1990**, 4, 761–765.
271. Chabner, B. A.; Hande, K. R.; Drake, J. C. *Bull Cancer* **1979**, 66, 89–92.
272. Liliemark, J. O.; Plunkett, W. *Cancer Res* **1986**, 46, 1079–1083.
273. Kunz, B. A. *Mutat Res* **1988**, 200, 133–147.
274. Meuth, M. *Exp Cell Res* **1989**, 181, 305–316.
275. Ohno, Y.; Spriggs, D.; Matsukage, A.; Ohno, T.; Kufe, D. *Cancer Res* **1988**, 48, 1494–1498.
276. Huang, P.; Chubb, S.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W. *Cancer Res* **1991**, 51, 6110–6117.
277. Bjorklund, S.; Skog, S.; Tribukait, B.; Thelander, L. *Biochemistry* **1990**, 29, 5452–5458.
278. Goan, Y. G.; Zhou, B.; Hu, E.; Mi, S.; Yen, Y. *Cancer Res* **1999**, 59, 4204–4207.
279. Graham, F. L.; Whitmore, G. F. *Cancer Res* **1970**, 30, 2636–2644.
280. Allaudeen, H. S.; Kozarich, J. W.; Sartorelli, A. C. *Nucleic Acids Res* **1982**, 10, 1379–1387.
281. Yoshida, S.; Yamada, M.; Masaki, S. *Biochim Biophys Acta* **1977**, 477, 144–150.
282. Parker, W. B.; Shaddix, S. C.; Chang, C. H.; White, E. L.; Rose, L. M.; Brockman R. W.; Shortnacy, A. T.; Montgomery, J. A.; Secrist, J. Ad.; Bennett, L. L. Jr. *Cancer Res* **1991**, 51, 2386–2394.
283. Tseng, W. C.; Derse, D.; Cheng, Y. C.; Brockman, R. W.; Bennett, L. L. Jr. *Mol Pharmacol* **1982**, 21, 474–477.
284. Higashigawa, M.; Ido, M.; Nagao, Y.; Kuwabara, H.; Hori, H.; Ohkubo, T.; Kawasaki, H.; Sakurai, M. *Leuk Res* **1991**, 15, 675–681.
285. Tanaka, M.; Yoshida, S. *Cancer Res* **1982**, 42, 649–653.
286. Reed, J. C. *J. Cell Biol* **1994**, 124, 1–6.
287. Miyashita, T.; Harigai, M.; Hanada, M.; Reed, J. C. *Cancer Res* **1994**, 54, 3131–3135.
288. Miyashita, T.; Reed, J. C. *Cell* **1995**, 80, 293–299.
289. Avramis, V. I.; Nandy, P.; Kwock, R.; Solorzano, M. M.; Mukherjee, S. K.; Danenberg, P.; Cohen, L. J. *Anticancer Res* **1998**, 18, 2327–2338.
290. Gartenhaus, R. B.; Wang, P.; Hoffman, M.; Janson D.; Rai, K. R. *J Mol Med* **1996**, 74, 143–147.
291. el Roubi, S.; Thomas, A.; Costin, D.; Rosenberg, C. R.; Potměšil, M.; Silber, R.; Newcomb, E. W. *Blood* **1993**, 82, 3452–3459.
292. Wattel, E.; Preudhomme, C.; Hecquet, B.; Vanrumbeke, M.; Quesnel, B.; Dervite, I.; Morel, P.; Fenaux, P. *Blood* **1994**, 84, 3148–3157.
293. Johnston, J. B.; Daeninck, P.; Verburg, L.; Lee, K.; Williams, G.; Israels, L. G.; Mowat, M. R.; Begleiter, A. *Leuk Lymphoma* **1997**, 26, 435–449.
294. Dohner, H.; Fischer, K.; Bentz, M.; Hansen, K.; Benner, A.; Cabot, G.; Diehl, D.; Schlenk, R.; Coy, J.; Stilgenbauer, S. *Blood* **1995**, 85, 1580–1589.
295. Lens, D.; Dyer, M. J.; Garcia-Marco, J. M.; De Schouwer, P. J.; Hamoudi, R. A.; Jones, D.; Farahat, N.; Matutes, E.; Catovsky, D. *Br. J Haematol* **1997**, 99, 848–857.
296. Kasimir-Bauer, S.; Ottinger, H.; Meusers, P.; Beelen, D. W.; Brittinger, G.; Seeber, S.; Scheulen, M. E. *Exp Hematol* **1998**, 26, 1111–1117.
297. Kitada, S.; Andersen, J.; Akar, S.; Zapata, J. M.; Takayama, S.; Krajewski, S.; Wang, H. G.; Zhang, X.; Bullrich, F.; Croce, C. M.; Rai, K.; Hines, J.; Reed, J. C. *Blood* **1998**, 91, 3379–3389.

298. Lomo, J.; Smeland, E. B.; Krajewski, S.; Reed, J. C.; Blomhoff, H. K. *Cancer Res* **1996**, 56, 40–43.
299. Gottardi, D.; Alfarano, A.; De Leo, A. M.; Stacchini, A.; Aragno, M.; Rigo, A.; Veneri, D.; Zanotti, R.; Pizzolo, G.; Caligaris-Cappio, F. *Br. J Haematol* **1996**, 889 94, 612–618.
300. Thomas, A.; El Rouby, S.; Reed, J. C.; Krajewski, S.; Silber, R.; Potmesil, M.; Newcomb, E. W. *Oncogene* **1996**, 12, 1055–1062.
301. McConkey, D. J.; Chandra, J.; Wright, S.; Plunkett, W.; McDonnell, T. J.; Reed, J. C.; Keating, M. *J Immunol* **1996**, 156, 2624–2630.
302. Bromidge, T. J.; Turner, D. L.; Howe, D. J.; Johnson, S. A.; Rule, S. A. *Leukemia* **1998**, 12, 1230–1235.
303. Zaja, F.; Di Loreto, C.; Amoroso, V.; Salmaso, F.; Russo, D.; Silvestri, F.; Fanin, R.; Damiani, D.; Infanti, L.; Mariuzzi, L.; Beltrami, C. A.; Baccarani, M. *Leuk Lymphoma* **1998**, 28, 567–572.
304. Morabito, F.; Filangeri, M.; Callea, I.; Sculli, G.; Callea, V.; Fracchiolla, N. S.; Neri, A.; Brugiattelli, M. *Haematologica* **1997**, 82, 16–20.
305. Feng, L.; Achanta, G.; Pelicano, H.; Zhang, W.; Plunkett, W.; Huang, P.; *Int J Mol Med* **2000**, 5, 597–604.
306. Pettitt, A. R.; Sherrington, P. D.; Cawley, J. C. *Br J Haematol* **1999**, 106, 1049–1051.
307. Holý, A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, Univerzita Palackého v Olomouci, **2004**, ISBN 80-244-0855-4
308. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Health and Research Topics. HIV/AIDS. Understanding. Causes. How HIV Causes AIDS. More on How HIV Causes AIDS
<https://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/howHIVCausesAIDS/Pages/howshiv.aspx> > (aktualizováno 5. ledna 2009).
309. Mehellou, Y.; De Clercq, E. *J Med Chem* **2010**, 53, 521–538.
310. De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Holý, A. *Science* **1978**, 200, 563–565.
311. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1977**, 74, 5716–5720.
312. Schaeffer, H. J.; Beauchamp, L.; de Miranda, P.; Elion, G. B.; Bauer, D. J.; Collins, P.; *Nature* **1978**, 272, 583–585.
313. De Clercq, E. *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2, 704–720.
314. 5. De Clercq, E., in press. *Nucleos Nucleot Nucl* **2005**, 24, 1395–1415.
315. Bray, M.; Driscoll, J.; Huggins, J. W. *Antivir Res* **2000**, 45, 135–147.
316. Bray, M.; Raymond, J. L.; Geisberg, T.; Baker, R. O. *Antivir Res* **2002**, 55, 151–159.
317. De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P. J.; Jones, A. S.; Walker, R. T. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1979**, 76, 2947–2951.
318. De Clercq, E. *Biochem Pharmacol* **2004**, 68, 2301–2315.
319. De Clercq, E. *Med Res Rev* **2003**, 23, 253–274.
320. McGuigan, C.; Yarnold, C. J.; Jones, G.; Velázquez, S.; Barucki, H.; Brancale, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J Med Chem* **1999**, 42, 4479–4484.
321. McGuigan, C.; Barucki, H.; Blewett, S.; Carangio, A.; Erichsen, J. T.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J Med Chem* **2000**, 43, 4993–4997.
322. Andrei, G.; Sienaert, R.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Snoeck, R.; *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 1081–1086.
323. De Clercq, E. *Med Res Rev* **2003**, 23, 253–274.
324. Mitsuya, H.; Broder, S. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1986**, 83, 1911–1915.
325. Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1985**, 82, 7096–7100.
326. Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Desmyter, J.; Vandeputte, M. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**, 142, 128–134.
327. De Clercq, E. *Antivir Res* **2005**, 67, 56–75
328. Balzarini, J.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Cooney, D. A.; Kang, G.-J.; Dalal, M.; Johns, D. G.; Broder, S. *Biochem Biophys Res Commun* **1986**, 140, 735–742.

329. Herdewijn, P.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Pauwels, R.; Baba, M.; Broder, S.; Vanderhaeghe, H. *J Med Chem* **1987**, 30, 1270–1278.
330. Balzarini, J.; Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; Wood, S. G.; Robins, M. J.; De Clercq, E. *Mol Pharmacol* **1988**, 33, 243–249.
331. Evaluategroup. Completed phase II study with MIV-310 does not justify further development by Boehringer Ingelheim
<http://www.evaluategroup.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=66649>
(aktualizováno 15. května 2016).
332. Chen, S.-H.; Lin, S.; King, I.; Spinka, T.; Dutschman, G. E.; Gullen, E. A.; Cheng, Y.-Ch.; Doyle, T. W. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, 8, 3245–3250.
333. DeJesus, E., et al. *Elvucitabine phase II interim results show safety and efficacy profiles similar to lamivudine in naive HIV-infected patients*. Seventeenth International AIDS Conference, Mexico City, abstract TUPE0010, **2008**
334. Achillion Pharmaceuticals website
<http://files.shareholder.com/downloads/ACHN/1050979136x0xS1193125-15-175915/1070336/filing.pdf> (aktualizováno 3. prosince 2015).
335. Lagociclovir valactate. Web <<http://adisinsight.springer.com/drugs/800015321>>
(aktualizováno 9. září 2013)
336. Dapivirine. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). NIAID ChemDB, HIV Drugs in Development
<http://chemdb.niaid.nih.gov/DrugDevelopmentHIV.aspx>. (aktualizováno 1. ledna 2016).
337. Hurwitz, S. J.; Asif, G.; Fromentin, E.; Tharnish, P. M.; Schinazi, R. F. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, 54 (3), 1248–55.
338. Herman, B. D.; Sluis-Cremer, N. Molecula Pharmacology of Nucleoside and Nucleotide HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. In: Gallelli L, ed. *Pharmacology*. In Tech, DOI: 10.5772/32969; **2012**, 63–80.
339. Lennerstrand, J.; Chu, C. K.; Schinazi, R. F. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 2078–2084.
340. Chu, C. K.; Yadav, V.; Chong, Y. H.; Schinazi, R. F. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3949–3952.
341. Deville-Bonne, D.; El Amri, C.; Meyer, P.; Chen, Y.; Agrofoglio, L. A.; Janin, J. *Antivir Res* **2010**, 86, 101–120.
342. Wang, P.; Rachakonda, S.; Zennou, V.; Keilman, M.; Niu, C., et al. *Antivir Chem Chemother* **2012**, 22, 217–238.
343. De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Discov* **2002**, 1, 13–25.
344. Michailidis, E.; Marchand, B.; Kodama, E. N.; Singh, K.; Matsuoka, M.; Kirby, K. A.; Ryan, E. M.; Sawani, A. M.; Nagy, E.; Ashida, N.; Mitsuya, H.; Parniak, M. A.; Sarafianos, S. G. *J Biol Chem* **2009**, 18, 284(51), 35681–3591.
345. Bethell, R. C.; Lie, Y. S.; Parkin, N. T. *Antivir Chem Chemother* **2005**, 16, 295–302.
346. Gu, Z., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, 625–631.
347. AIDSinfo. Drugs. Apricitabine <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/415/apricitabine/0/patient>
(aktualizováno 1. prosince 2015).
348. Nitanda, T., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 3355–3360.
349. Wang, X.; Tanaka, H.; Baba, M.; Cheng, Y. C. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, 53, 3317–3324.
350. Baba, M.; Tanaka, H.; De Clercq, E.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Schols, D.; Nakashima, H.; Perno, C.-F.; Walker, R. T.; Miyasaka, T. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, 165, 1375–1381.
351. Baba, M.; Shigeta, S.; Yuasa, S.; Takashima, H.; Sekiya, K.; Ubasawa, M.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Walker, R. T.; De Clercq, E. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, 38, 688–692.
352. De Clercq, E. *Chem Biodivers* **2004**, 1, 44–64.
353. Pauwels, R. *Curr Opin Pharmacol* **2004**, 4, 437–446.
354. Pubchem. Compound. Emivirine
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Emivirine#section=Top> (aktualizováno 7. května 2016).

355. De Clercq, E. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2, 581–587.
356. De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Baba, M.; Schols, D.; Nakashima, H.; Balzarini, J.; Debyser, Z.; Murrer, B. A.; Schwartz, D.; Thornton, D.; Bridger, G.; Fricker, S.; Henson, G.; Abrams, M.; Picker, D. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1992**, 89, 5286–5290.
357. De Clercq, E.; Yamamoto, N.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Witvrouw, M.; De Vreese, K.; Debyser, Z.; Rosenwirth, B.; Peichl, P.; Datema, R.; Thornton, D.; Skerlj, R.; Gaul, F.; Padmanabhan, S.; Bridger, G.; Henson, G.; Abrams, M. *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, 38, 668–674.
358. Hendrix, C. W.; Flexner, C.; MacFarland, R. T.; Giandomenico, C.; Fuchs, E. J.; Redpath, E.; Bridger, G.; Henson, G. W. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, 1667–1673.
359. National Cancer Institute. About Cancer. Cancer Treatment. A to Z list of cancer Drugs. FDA Approval for Plerixafor <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-plerixafor> (aktualizováno 3. července 2013).
360. De Clercq, E. *Biochem Pharmacol* **2011**, 82, 99–109.
361. De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. *Nature* **1986**, 323, 464–467.
362. De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I.; Holý, A. *Antivir Res* **1987**, 8, 261–272.
363. De Clercq, E. *Clin Microbiol Rev* **2003**, 16, 569–596.
364. De Clercq, E. *Expert Rev. Anti-infect Ther* **2003**, 1, 21–43.
365. De Clercq, E. *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2, 704–720.
366. Balzarini, J.; Holý, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; De Clercq, E. *Antimicrob Agents Chemother* **1993**, 37, 332–338.
367. Eisenberg, E. J.; He, G. X.; Lee, W. A. *Nucleos Nucleot Nuc* **2001**, 20, 1091–1098.
368. Chapman, H.; Kernan, M.; Prisbe, E.; Rohloff, J.; Sparacino, M.; Terhorst, T., et al. *Nucleos Nucleot Nuc* **2001**, 20, 621–628.
369. Chapman, H.; Kernan, M.; Rohloff, J.; Sparacino, M.; Terhorst, T. *Nucleos Nucleot Nuc* **2001**, 20, 1085–1090.
370. Lee, W. A.; He, G. X.; Eisenberg, E.; Cihlar, T.; Swaminathan, S.; Mulato, A., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 1898–1906.
371. Birkus, G.; Wang, R.; Liu, X.; Kutty, N.; MacArthur, H.; Cihlar, T., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 543–550.
372. Birkus, G.; Kutty, N.; He, G. X.; Mulato, A.; Lee, W.; McDermott, M., et al. *Mol Pharmacol* **2008**, 74, 92–100.
373. Markowitz, M.; Zolopa, A.; Ruane, P.; Squires, K.; Zhong, L.; Kearney, B., et al. *GS-7340 demonstrates greater declines in HIV-1 RNA than TDF during 14 days of monotherapy in HIV-1-infected subjects*. In: Abstracts of the 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, **2011**.
374. De Clercq, E.; Sakuma, T.; Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Rosenberg, I., et al. *Antivir Res* **1987**, 8, 261–272.
375. Hou, J.; Li, Y.; Zhou, Z.; Valiaeva, N.; Beadle, J. R.; Hostetler, K.; et al. *Molecular Vision* **2011**, 17, 627–637.
376. Naesens, L.; Hatse, S.; Segers, C.; Verbeken, E.; De Clercq, E.; Waer, M., et al. *Oncol Res* **1999**, 11, 195–203.
377. Schinkmanová, M.; Votruba, I.; Holý, A. *Biochem Pharmacol* **2006**, 71, 1370–1376.
378. Wolfgang, G. H.; Shibata, R.; Wang, J.; Ray, A. S.; Wu, S.; Doerrfler, E., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, 53, 2777–2784.
379. Reiser, H.; Wang, J.; Chong, L.; Watkins, W. J.; Ray, A. S.; Shibata, R., et al. *Clinical Cancer Res* **2008**, 14, 2824–2832.
380. Tsai, C. Y.; Ray, A. S.; Tumas, D. B.; Keating, M. J.; Reiser, H.; Plunkett, W. *Clinical Cancer Res* **2009**, 15, 3760–3769.
381. Holý, A.; Votruba, I.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Naesens, L., et al. *J Med Chem* **2002**, 45, 1918–1929.
382. Hocková, D.; Holý, A.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Clercq, E., et al. *J Med Chem* **2003**, 46, 5064–5073.

383. De Clercq, E.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Leyssen, P.; Naesens, L.; Neyts, J., et al. *Nucleos Nucleot Nucl* **2005**, 24, 331–341.
384. Balzarini, J.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Aquaro, S.; Perno, C. F.; Egberink, H., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 2185–2193.
385. Balzarini, J.; Schols, D.; Van Laethem, K.; De Clercq, E.; Hocková, D.; Masojídková, M., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 59, 80–86.
386. Ying, C.; Holý, A.; Hocková, D.; Havlas, Z.; De Clercq, E.; Neyts, J. *Antimicrob Agents Chemother* **2005** 49, 1177–1180.
387. Stittelaar, K. J.; Neyts, J.; Naesens, L.; van Amerongen, G.; van Lavieren, R. F.; Holý, A., et al. *Nature* **2006**, 439, 745–748.
388. Herman, B. D.; Votruba, I.; Holý, A.; Sluis-Cremer, N.; Balzarini, J. *J Biol Chem* **2010**, 285, 12101–12108.
389. Krečmerová, M.; Holý, A.; Pískala, A.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Naesens, L., et al. *J Med Chem* **2007**, 50, 1069–1077.
390. Krečmerová, M.; Holý, A.; Pohl, R.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Naesens, L., et al. *J Med Chem* **2007**, 50, 5765–5772.
391. Naesens, L.; Andrei, G.; Votruba, I.; Krečmerová, M.; Holý, A.; Neyts, J., et al. *Biochem Pharmacol* **2008**, 76, 997–1005.
392. Lebeau, I.; Andrei, G.; Krečmerová, M.; De Clercq, E.; Holý, A.; Snoeck, R. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 2268–2273.
393. Duraffour, S.; Snoeck, R.; Krečmerová, M.; van Den Oord, J.; De Vos, R.; Holý A., et al. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 4410–4419.
394. Mendel, D. B.; Chilar, T.; Moon, K.; Chen, M. S. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, 641–646.
395. Naesens, L.; Balzarini, J.; Rosenberg, I., et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1989**, 8, 1043–1047.
396. Wu, T.; Froeyen, M.; Kempeneers, V., et al. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 5056–5065.
397. Pohjala, L.; Barai, V.; Azhayev, A.; Lapinjoki, S.; Ahola, T. *Antivir Res* **2008**, 78, 215–222.
398. Fischer, E.; Helferich, B. *Ber Dtsch Chem Ges* **1914**, 47, 210–235.
399. Todd, J. *Chem Soc* **1948**, 967–969.
400. John Davoll, Bertram A. Lowy *Am Chem Soc* **1951**, 73, 1650–1655.
401. Kazimierczuk, Z.; Robins, K. R. *J. Am Chem Soc* **1984**, 106 (21), 6379–6382.
406. Witkowski, J. T. *J Med Chem* **1972**, 15, 1150–1154.
407. Balzarini, J.; Lee, C.-K.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *J Biol Chem* **1991**, 266, 21509–21514.
408. Nakazaki, N.; Sekiya, M.; Yoshino, T.; Ishido, Y. *Bull Chem Soc Jpn* **1973**, 46, 3858.
409. Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. *Science* **1929**, 69, 579–580.
410. Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. *J. Am Chem Soc* **1930**, 52, 4489–4494.
411. Nishimura, T.; Shimizu, B.; Iwai, I. *Chem Pharm Bull* **1963**, 11, 1470–1472.
412. Birkofer, L.; Richter, P.; Ritter, A. *Chem Ber* **1960**, 93, 2804.
413. Birkofer, L.; Kühntau, H. P.; Ritter, A. *Ibid* **1960**, 93, 2810.
414. Fessenden, R.; Fessenden, J. S. *Chem Rev* **1961**, 61, 361.
415. Langer, S. H.; Connell, S.; Wender, I. *J Org Chem* **1958**, 23, 50.
416. Fessenden, R.; Crowe, D. F. *Ibid* **1960**, 25, 598.
417. Vorbrüggen, H. *Angew Chem Int Ed* **1970**, 9, 461–462.
418. Sniady, A.; Bedore, M. W.; Jamison, T. F. *Angew Chem Int Ed* **2011**, 50.9, 2155–2158.
419. Vorbrüggen, H. *Tet Lett* **1978**, 19, 1339–1342.
420. Simons, C. *Nucleoside mimetics : their chemistry and biological properties* ISBN: 90-5699-324-0 Edice: Advanced chemistry texts ; vol. 3 Nakladatelství Amsterdam: Gordon and Breach, **2001**.
421. Vorbrüggen, H. *Tet Lett* **1995**, 36, 7845–7848.
422. Zhang, H.-C.; Daves, Jr. G. D. *J Org Chem* **1992**, 57, 4690–4696.
423. Gryniewicz, G. *Pol J Chem* **1979**, 53, 1571.
424. Schmalisch, S.; Mahrwald, R. *Org Lett* **2013**, 15, 5854.
425. Downey, A. M.; Richter, C. *Org Lett* **2015**, 17, 4604–4607.

426. Robins, M. J.; Wilson, J. S. *J Am Chem Soc* **1981**, 103, 932-933.
427. Chanteloup, L.; Thuong, N. *Tet Lett* **1994**, 35, 877-880.
428. Zhang, J.; Liu, Z.; Li, D.; Yin, B. *Tet Lett* **2010**, 51, 240-243.
429. Sagimura, H.; Osumi, K.; Kodaka, Y.; Sujino, K. *J Org Chem* **1994**, 59, 7653-7660.
430. Hanessian, S.; Bacquet, C.; Lehong, N. *Carbohydr Res* **1980**, 80, C17-C22.
431. Prévost, M.; St-Jean, O.; Guindon, Y. *J. Am Chem Soc* **2010**, 132, 12433-12439.
432. Schmidt, R. R. *Angew. Chem Int Edit* **1986**, 25, 212-235.
433. Shaw, G.; Warrenner, R. N. *J Chem Soc* **1958**, 42, 2294-2299.
434. Baddiley, Buchanan; Hodges; Prescott J. F. *Proc Chem Soc* **1957**, 148, 4769.
435. Bertho A. *Ber.* **1930**, 63, 836.
436. Rousseau, R. J.; Robins, R. K.; Townsend, L. B. *J Am Chem Soc* **1968**, 90, 2661-2668.
437. Baccolini, G.; Boga, C.; Micheletti, G. *Chem Commun* **2011**, 47, 3640-3642.
438. Wan, Z. K.; Binnun, E.; Douglas, P. W.; Lee, J. *Org Lett* **2005**, 7 (26), 5877-5880
439. Seela, F.; Herdering, W.; Kehne, A. *Helv Chim Acta* **1987**, 70, 1649-1660
440. Łodyga-Chruścińska, E.; Ołdziej, S.; et. al. *J Inorg Biochem* **2011**, 105, 1212-1219
441. Francom. P.; Robins, M. J. *J Org Chem* **2003**, 68, 666-669