

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Studium syntézy a biologické aktivity vybraných derivátů 2-substituovaných-9-cyklopentyl-6-biarylamino-9*H*-purinu

Bakalářská práce

Autor:	Růžena Padrtová
Studijní program:	B1407
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Forma studia:	prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala 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, dne 13.5.2015

.....

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za trpělivost a vstřícnost při vedení mé bakalářské práce, dále za cenné rady, odborné konzultace a kritické připomínky, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce poskytoval. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů a Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, především RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při provedení experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Růžena Padrtová
Název práce:	Studium syntézy a biologické aktivity vybraných derivátů 2-substituovaných-9-cyklopentyl-6-biarylamino-9- <i>H</i> purinu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	Práce je soustředěna na studium přípravy a biologických účinků nových 2,6,9- trisubstituovaných purinových inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDKs) odvozených od struktury roskovitinu. Teoretická část zahrnuje literární rešerši o roli CDKs a několika strukturně různých i velmi podobných typů CDKs inhibitorů se zaměřením na způsob přípravy, selektivitu, biologickou aktivitu a možné terapeutické využití. Experimentální část je věnována třístupňové syntéze 4 nových 2,6,9- trisubstituovaných purinových CDK inhibitorů, které jsou v poloze C2 substituovány trans-1,4-diaminocyklohexylamino skupinou, v poloze N9 cyklopentylem a v poloze C6 různými amino-deriváty.
Klíčová slova:	cyklin-dependentní kinázy, inhibitory cyklin dependentních kináz, 2,6,9-trisubstituované puriny, antiproliferační účinky, roskovitin, bioisostery, protinádorové účinky

Počet stran:	76
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name

and surname:

Růžena Padrtová

Title:

The Study of Synthesis and Biological Activity of
Selected 2-Substituted-9-cyclopentyl-6-
biarylamino-9H-purine Derivatives

Type of thesis:

Bachelor

Department:

Centre of the Region Haná for Biotechnological
and Agricultural research, Laboratory of Growth
Regulators

Supervizor:

RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

The year of presentation:

2015

Abstract:

The work is focused on the study of preparation and biological effects of new 2,6,9-trisubstituted purine inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs), derived from the structure of roscovitine. The theoretical part includes a literature review about role of CDKs and several types of CDKs inhibitors with similar or different structure core, with a focus on methods of preparation, selectivity, biological activity and possible therapeutic use. The experimental part is devoted to three-steps synthesis of four new 2,6,9-trisubstituted purine inhibitors of CDKs with trans-1,4-diaminocyclohexylamino group at the C2 position, cyclopentyl at the N9 position and various amino-derivatives at the C6 position.

Keywords:

cyclin dependent kinases, inhibitors of cyclin-

dependent kinases, 2,6,9-trisubstitued purine,
antiproliferative effects, roscovitine, bioisosteres,
antitumor effects

Number of pages: 76

Number of appendices: 2

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	CÍLE PRÁCE.....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
	3.1 Fyziologické funkce cyklin-dependentních kináz	12
	3.1.1 Struktura a klasifikace cyklin-dependentních kináz	12
	3.1.2 Role cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu	13
	3.1.3 Specifika cyklin-dependentních kináz u vybraných patologických procesů.....	16
	3.2 Možnosti inhibice cyklin-dependentních kináz.....	18
	3.2.1 Stručný přehled inhibitorů CDK.....	18
	3.2.2 Terapeutický potenciál CDK inhibitorů ve vztahu k selektivitě k CDK	26
	3.3 CDK inhibitory 2,6,9-trisubstituované purinové řady	28
	3.3.1 Vztah mezi strukturou a účinkem CDK inhibitorů 2,6,9- trisubstituované purinové řady	36
	3.3.2 Syntetické přístupy k 2,6,9-trisubstituovaným purinovým derivátům	37
4	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY	41
	4.1 Syntéza prekurzorů	42
	4.2 S_N2 v poloze C6	42
	4.3 S_N2 v poloze C2	42
	4.4 Biologická aktivita připravených inhibitorů 44a – 44d	43
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
	5.1 Materiál a metody	44
	5.2 Syntéza prekurzorů	45
	5.2.1 2,6-Dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (Mitsunobu alkylace)	45
	5.2.2 6-Brompyridin-3-amin	46
	5.2.3 6-(Thiofen-2-yl)pyridin-3-amin (Suzuki coupling)	46
	5.2.4 Obecný postup přípravy látek 43a – 43d.	47
	5.2.4.1 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-morfolinofenyl)-9H-purin-6-amin (43a)	48
	5.2.4.2 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-9H-purin-6- amin (43b)	49
	5.2.4.3 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)fenyl)-9H-purin 6-amin (43d)	49
	5.2.4.4 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)-9H-purin-6 amin (43c).....	50
	5.3 Syntéza cílových inhibitorů.....	51
	5.3.1 Obecný postup přípravy látek 44a - 44d.	51
	5.3.1.1 N ² -(4-Aminocyclohexyl)-9-cyclopentyl-N ⁶ -(4-morfolinofenyl)-9H- purin-2,6-diamin (44a)	51
	5.3.1.2 N ² -(4-Aminocyclohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4- (morfolinomethyl)fenyl)-9H-purin-2,6-diamin (44b)	52
	5.3.1.3 N ² -(4-aminocyclohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-(4-ethylpiperazin-1- yl)fenyl)-9H-purin-2,6-diamin (44d)	52
	5.3.1.4 N ² -(4-aminocyclohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-(thiofen-2-yl)pyridin-3- yl)9H-purin-2,6-diamin (44c).....	53
6	ZÁVĚR	55
7	LITERATURA.....	56

8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	73
9	PŘÍLOHY	75

1 Úvod

Cyklin-dependentní kinázy (CDKs) jsou klíčovými regulátory především buněčného cyklu. V buněčném cyklu jsou specificky aktivovány asociací s cykliny a takto vzniklé komplexy následně fosforylují cíle zahrnující transkripční regulátory, které následně vyvolají genovou expresi, stimulaci DNA replikace či iniciaci mitosy (Kryštof & Uldrijan, 2010; Lapenna & Giordano, 2009). Poruchy či jisté odchylky v expresi, aktivitě nebo regulaci CDKs mají za následek různá virová, neurodegenerativní či nádorová onemocnění. Tento fakt přiměl výzkumné týmy se zaměřit na studium malých molekul CDKs inhibitorů (CDKi), u kterých bylo prokázáno, že umí inhibovat aktivitu CDKs a mají taktéž terapeutické využití (Cicenas & Valius, 2011). V dnešní době se řada z nich nachází v preklinické či klinické fázi testování a počet nových CDKi neustále roste (Dai & Grant, 2003).

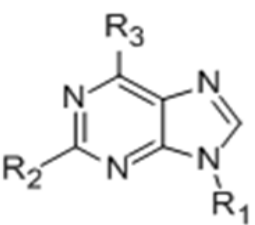
Jedním z prvních CDKi, které vstoupily do klinických studií, byl Flavopiridol (Whitlock *et al.*, 2005; Phelps *et al.*, 2009; Blum *et al.*, 2010) a Roskovitin z řady 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Havlíček *et al.*, 1997). Úspěšnost roskovitinu dále inspirovala k syntéze strukturně podobných sloučenin odvozených od této látky, z nichž některé vykazovaly až stonásobně vyšší selektivitu než zmíněný roskovitin (Jorda *et al.*, 2012). Vysoká selektivita a také pozitivní klinické výsledky byly prokázány u látky zvané dinaciclib, která se momentálně nachází již ve III. fázi klinických studií zaměřených na léčbu pacientů trpících chronickou lymfocytární leukémií CLL (Paruch *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2010; Feldmann *et al.*, 2011).

Výzkum těchto látek trvá již přes 20 let (Kryštof & Uldrijan, 2010; Lapenna & Giordano, 2009), dosud však nebyl připraven takový CDKs inhibitor, který by neměl nežádoucí vedlejší projevy na lidský organismus. Ani toto vědomí vědce neodrazuje, naopak vybízí k vývoji dalších nových chemoterapeutik odvozených od CDKi, které blokují postup buněčného cyklu, spouštějí buněčnou smrt, a projevují silné protinádorové účinky nejen na buněčných liniích, ale i *in vivo* (Kryštof & Strnad, 2001).

2 Cíle práce

Cílem práce byla příprava řady nových 2-(4-aminocyklohexylamino)-6-subst. arylamino-9-cyklopentyl-9H-purinů, jako potenciálních inhibitorů cyklin dependentních kináz. Na základě předchozích studií byly vybrány substituenty uvedené v (Tab. 1). Práce zahrnovala sérii třístupňových syntéz s optimalizací nukleofilní substituce, základní metody strukturní analýzy připravených látek a vyhodnocení dat z biologických experimentů.

Tabulka 1: *Substituce purinového jádra v poloze N9, C6 a C2.*

	Poloha N9	Cyklopentyl
	Poloha C6	4-morfolin-4-yl-fenylamino
		4-morfolin-4-yl-methylfenylamino
		4-(4-ethylpiperazin-1-yl)fenylamino
	Poloha C2	Trans-1,4-diaminocyklohexylamino

3 Teoretická část

3.1 Fyziologické funkce cyklin-dependentních kináz

3.1.1 Struktura a klasifikace cyklin-dependentních kináz

Cyklin-dependentní kinázy (zkráceně CDKs) jsou heterodimerní enzymy, neboli též protein kinasy, které zahrnují jak katalyckou podjednotku CDK, tak i regulační cyklinovou podjednotku (Malumbres & Barbacid, 2005; Chen *et al.*, 2006). Aktivace samotné CDK spočívá ve dvou krocích. Nejprve dojde k asociaci CDK s cyklinem za vzniku komplexu, který kinázu částečně aktivuje (Morgan, 1995). K úplné aktivaci kinázy je nutná fosforylace komplexu CDK-cyklin aktivační kinázou CAK (Fisher & Morgan, 1994; Espinoza *et al.*, 1996; Kaldis *et al.*, 1996). Kompletní CDK následně katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na serinový či threoninový zbytek v dané sekvenci aminokyselinového řetězce (Kryštof a Strnad, 2001). Takto aktivované kinázy poté mohou být potlačeny 2 rodinami inhibujících proteinů buněčného cyklu, a to Cip/Kip a INK4 (Sherr & Roberts, 1995). Struktura CDK (především CDK2) je tvořena menší N a větší C terminální doménou, kde N doména je složena z β listů a C-terminální doména z α -helixů. Vazba ATP a všech inhibitorů je uskutečněna právě mezi těmito dvěma doménami (Schulze-Gammon *et al.*, 1995; De Azevedo *et al.*, 1997).

Genom u člověka kóduje 20 CDK, avšak v řízení buněčného cyklu má pravděpodobně přímé uplatnění pouze 5 z nich, konkrétně se jedná o CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 a CDK6 (Malumbres & Barbacid, 2005; Chen *et al.*, 2006). Ke každé fázi buněčného cyklu je přiřazena specifická CDK. Postup buňky G1 fázi je regulován CDK4, CDK6-cyklin D a CDK2-cyklin D. G0 fáze je ovlivněna komplexem CDK3-cyklin C, průběh S fáze řídí spojení CDK2-cyklin A a CDK1-cyklin A a komplex CDK1-cyklin B je důležitý při přechodu z G2 do M fáze. Mimo regulaci buněčného cyklu mají CDK důležitou úlohu např. v apoptóze (CDK2), dále se uplatňují při řízení buněčné diferenciaci v nervových a svalových buňkách (CDK5) a v neposlední řadě mají zásluhu i na aktivaci transkripce (CDK7-9) (Knockaert *et al.*, 2002).

Funkce CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 a CDK6, které se podílí na regulaci buněčného cyklu, je podrobněji popsána v kapitole 3.1.2 Role cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu (viz níže).

V post-mitotické fázi neuronálních buněk (oblasti neuronů) působí především CDK5, která je schopná fosforylovat několik cytoskeletálních proteinů (Malumbres & Barbacid, 2005). CDK5 je též velmi důležitá pro neuronální zastavení buněčného cyklu, diferenciaci a její deregulace je typická při různých nervových onemocněních (Zhang *et al.*, 2008; Maestre *et al.*, 2008).

CDK7 až CDK11 mají důležitou úlohu v transkripci, některé z nich se však uplatňují i při řízení buněčného cyklu (Lolli & Johnson, 2005). Komplex CDK7/cyklin H je schopen fosforylovat a zároveň aktivovat CDK buněčného cyklu, jedná se především o CDK2 a CDK1 (Larochelle *et al.*, 2007). Kromě toho je tento komplex spojován s iniciací transkripce pomocí transkripčních faktorů TFIIF a také s fosforylací C-terminální domény RNA polymerázy II (Fisher, 2005).

Nedílnou součástí holoenzymu RNA polymerázy je asociace CDK8 s cyklinem C (Akoulitchev *et al.*, 2000). Vzniklý komplex CDK8/cyklin C má několik funkcí: a) fosforyluje cyklin H pro inhibici CAK aktivity a za b) spolu s komplexem CDK9/cyklinT dokáže regulovat transkripci fosforylací C-terminální domény již zmíněné RNA polymerázy II. Tvorba komplexů CDK9/cyklinT a CDK9/cyklinK dává vznik transkripčním faktorům P-TEFb, které mají podíl na transkripční elongaci RNA polymerázy II (Garriga & Graña, 2004).

CDK10 pravděpodobně reguluje přechod z G2 do M fáze, nicméně dosud nebyl k této CDK zjištěn příslušný cyklinový partner. Mimo tuto funkci zastává CDK10 roli i při transkripci u savčích buněk, kde potlačuje (brzdí) transaktivaci transkripčních faktorů Ets2 (Kasten & Giordano, 2001).

CDK11, které po navázání cyklinu L tvoří komplex CDK11/cyklinL, interaguje nejen s RNA polymerázou II, nýbrž i s nascentní mRNA (Loyer *et al.*, 2005).

3.1.2 Role cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu

Rozmnožování buňky je zahájeno sledem dějů, při nichž dochází k jejímu růstu, znásobení komponent, replikaci DNA a následnému rozdělení na dvě dceřinné buňky, které jsou naprosto shodné s mateřskou. Celý tento koloběh je pak označován jako buněčný cyklus (Garrett, 2001). Tento cyklus zahrnuje celkem 4 fáze: G1 (first gap), S, G2 (second gap) a M. V G1 fázi reaguje buňka na mimobuněčné signály a růstové faktory, což jí umožní přímý přechod z G1 do tzv. S (synetické) fáze. Po kompletní

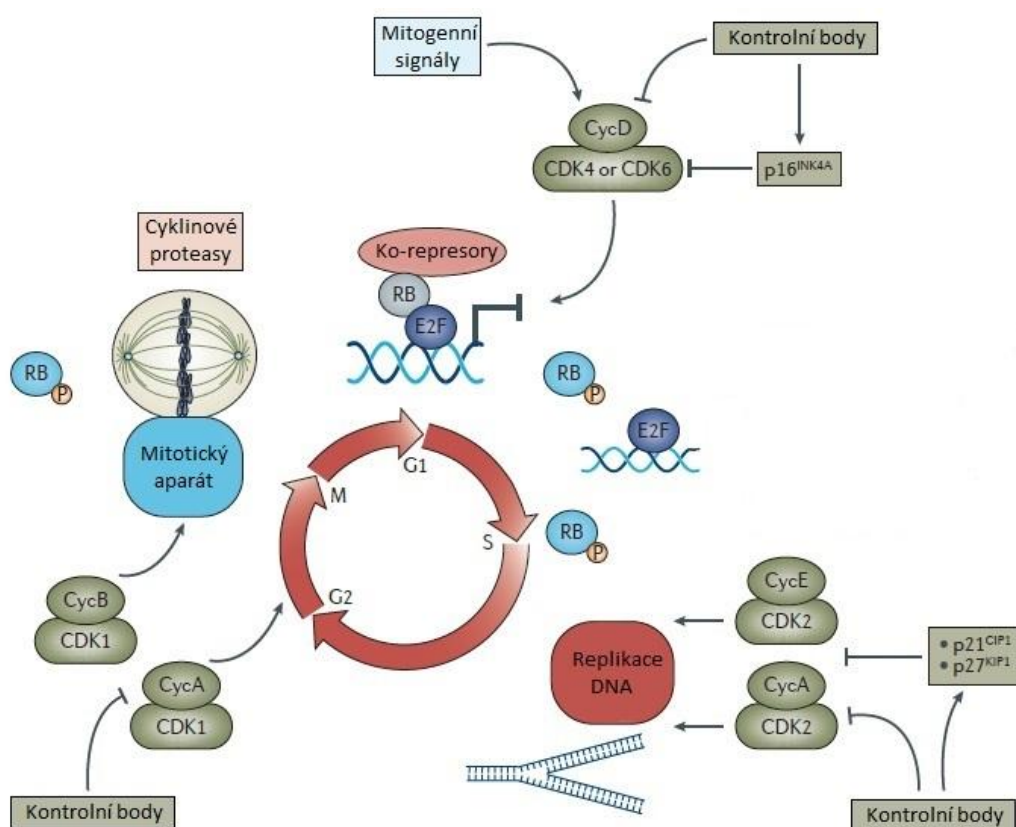
syntéze DNA v G2 fázi buňka vstoupí do M fáze (neboli mitózy), kde se tvoří mitotická vřeténka, dojde zde k segregaci sesterských chromatid a nakonec k rozdělení buňky. Kontrolní body zajišťují, aby buňka nevkočila do další fáze, dokud není zcela dokončena předchozí. Při porušení této zásady by totiž mohlo dojít k poškození či mutaci buňky. Stimulem pro přechod z klidové G0 fáze do fáze G1 je mimo jiné působení mitogenních a růstových faktorů (Israels^a & Israels^b, 2000).

Významnou roli během řízení buněčného cyklu plní cyklin dependentní kinázy (CDK). V buněčném cyklu přímo figuruje pouze 7 podjednotek CDK, konkrétně CDK 1,2,3,4,6,10,11 a čtyři cykliny A,B,D a E (De Lartigue, 2014). Pro úplnou aktivaci těchto proteinkináz je zapotřebí jejich vazba s cykliny. Tím se vytvoří komplexy, které jsou charakteristické pro danou fázi cyklu (Garrett, 2001).

V necyklické G0 fázi se nachází protein Rb (jaderný fosfoprotein vyskytující se v defosforylovaném stavu), který je výsledným produktem retinoblastoma genu a lze jej zařadit mezi tumorsupresorové geny. K blokaci proliferace a k setrvání buňky v klidovém stavu je potřeba, aby se transkripční faktory E2F a DP1 spojily s dalšími tzv. „pocket“ proteiny p107, p130. Buněčný cyklus je pak odstartován v G1 fázi fosforylací těchto „kapesních“ proteinů a povolením vazby E2F a DP1 (Vít, 2004). Ve střední až pozdní G1 fázi se spojuje cyklin E (CE) s CDK 2 a současně cyklin D (CD) s CDK 4/6. Vzniklý komplex CD s CDK 4/6 spustí fosforylaci pRb, dojde k aktivaci cílových genů E2F, buňka překoná restriční bod a je připravena na přechod z G1 do S fáze (De Lartigue, 2014). V S fázi se slučuje CDK2 s cyklinem A v komplex, který díky schopnosti fosforylovat substráty umožňuje syntetizovat DNA a současně inaktivovat transkripční faktory E2F (Knockaert *et al.*, 2002). Pro G2 fázi je typická CDK1 proteinkináza (označována také jako cdc2) vázaná na cyklin A. Nezbytná pro mitózu je též CDK1, jejímž vazebným partnerem je ovšem cyklin B (Shah & Schwartz, 2006).

Zatímco antiproliferační kontrolní body buď to inhibují aktivitu CDK4 a CDK6, nebo indukují expresi těchto CDK pomocí inhibitoru p16^{Ink4a} z rodiny INK4, mitogenní signály naopak stimulují funkci CDK4 a CDK6, čímž umožňují vstup do buněčného cyklu (Obr. 1). Aktivované komplexy CDK4/CycD a CDK6/CycD poté iniciují fosforylaci (P) klíčových substrátů, včetně nádorového supresoru RB, který spouští program genové exprese řídící rodinu transkripčních faktorů E2F. V G1 fázi je tedy zahájena transkripce, v S fázi se tvoří komplexy CDK2 s cykliny E a A, které dále

fosforylují RB a podněcují k replikaci DNA (Asghar *et al.*, 2015). Replikační kontrolní body v S fázi (Xu *et al.*, 2001) mohou přímo inhibovat aktivitu CDK2 nebo přimět CDK k vzájemné spolupráci s protein-inhibiční kinázou CIP/KIP, třídou inhibitorů $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$, vázat se k těmto CDK2 komplexům a inhibovat je. Po dokončení replikace DNA vytváří asociace CDK1 a cykliny A a B fosforylační cíle v G2 fázi. Pokud není poškozena DNA následuje segregace chromozomů, aktivace buňky komplexem CDK1/CycB a její vstup do mitosy. Silné kontrolní body však mohou omezit aktivitu CDK1 a zabránit tak postupu do mitosy. Proto je pro postup anafází a tvorbu 2 dceřinných buněk nutná degradace cyklinu B. Během tohoto přechodu z M do G1 fáze dochází k defosforylaci proteinu RB a reakcí na antiproliferační a mitogenní signály se cyklus znovu opakuje (Asghar *et al.*, 2015).



Obr. 1: Postup buněčného cyklu poháněného CDK (upraveno podle Asghar *et al.*, 2015).

Jak bylo podotknuto výše, CDKs pro svou aktivaci musí podstoupit dva kroky. Nejprve dojde k částečné aktivaci vazbou s cykliny, následně je vytvořený komplex fosforylován tzv. CDK-aktivační kinázou (CAK) (Fisher & Morgan, 1994; Espinoza *et*

al., 1996; Kaldis *et al.*, 1996). Takto aktivované kinázy mohou být poté utlumeny 2 rodinami inhibujících proteinů, a to Kips/Cips a INK4s (Sherr & Roberts, 1995). Kips/Cips neboli proteiny inhibující kinázy způsobují negativní regulaci komplexů CE/CDK2 a CA/CDK2. Do této skupiny lze řadit inhibitory p21^{waf1}, p27^{kip/cip1} a p57^{kip/cip2} (Sherr & Roberts, 1999). V lidských karcinomech se nejhojněji vyskytuje zmutovaný gen nádorového supresoru p53, který svým prostřednictvím napomáhá inhibujícímu proteinu p21^{waf1} zastavit buněčný cyklus (Levine, 1997). Inhibitor p27^{kip/cip1} není obvyklým nádorovým supresorem, geny se v něm totiž nemění, avšak jeho nízká hladina navozená degradací u některých typů rakoviny, souvisí se špatnou klinickou prognózou (Porter *et al.*, 1997). Další rodinou jsou INK4s (pro inhibitory CDK4), např. p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}, které umí navázat a inhibovat komplexy CD/CDK2, CD/CDK4 a CD/CDK6 (Sherr & Roberts, 1999). Bylo zjištěno, že u jedné třetiny všech nádorů se objevuje právě nádorový supresor p16^{Ink4a} (Serrano *et al.*, 1993; Kamb *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994).

Z důvodu časté deregulace funkce CDK u řady nádorů jsou CDK dobrým terapeutickým cílem a vývoj nízkomolekulárních inhibitorů CDK trvá již 20 let (Kryštof & Strnad 2001).

3.1.3 Specifika cyklin-dependentních kináz u vybraných patologických procesů

Cyklin-depenentní kináza 5 vyžaduje pro svou aktivaci proteiny p35 a p39, které se nachází v lidském mozku. Takto aktivovaná CDK5 poté fosforyluje řadu substrátů (Kesavapany *et al.*, 2004; Cruz & Tsai, 2004) a kromě toho se může podílet na rozvoji a správné funkci neuronů (Li *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že různá neurotoxická napadení zprostředkovaná kalpainem vyvolávají postupnou na vápníku závislou konverzi proteinů p35, p39 až po p25 a p29. Hyperaktivní komplexy vzniklé asociací CDK5 s p25 či CDK5 s p29 následně fosforylují proteiny cytoskeletu, což se v konečném důsledku projeví smrtí nervových buněk (Patrick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Deregulace CDK5 objevující se u řady neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova choroba (Cheung & Ip, 2012), naznačuje možný pozitivní vliv inhibitorů CDK5 na průběh či projevy právě těchto onemocnění (Knockaert *et al.*, 2002).

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění postihující převážně starší pacienty. Projevuje se deregulací mozkové činnosti, ztrátou jazykových

dovedností a postupnou a nevratnou změnou paměti (Gravitz, 2011). Je nejčastější příčinou demence a končí smrtí (Jirák, 2009). Pro AD je charakteristická hyperfosforylace Tau proteinu (zodpovědného za buněčnou smrt a tvorbu neurofibrilárních spleť (klubek)) (Götz *et al.*, 2012) a amyloidní- β tvorba (odpovědná za produkci extracelulárních amyloidních plaků) (Ittner^b & Götz, 2011). Tyto dva hlavní znaky AD jsou společné pro několik proteinových kináz. Vědci však zjistili, že vzorky odebrané z mozkové tkáně zesnulých pacientů, jež podlehlí AD, vykazují zvýšenou aktivitu především u CDK5. Studie AD na zvířatech následně potvrdila, že při tomto onemocnění dochází k deregulaci CDK5, která má vliv na úbytek neuronů (Cruz & Tsai, 2004). Intracerebrovertikulární injekce amyloidního- β (A β) peptidu (1-40) provedená na myších hyperaktivuje díky tvorbě proteinu p25 CDK5. Hyperaktivní CDK5 poté hyperfosforyluje Tau protein, následkem čehož dochází k atypické indukci buněčného cyklu, synaptické toxicitě a smrti neuronů (Lopes *et al.*, 2010). Nadměrná exprese proteinu p25 zvyšuje CDK5 zprostředkovanou transkripci β -sekretázy BACE1, která způsobí abnormální zpracování A β (Wen *et al.*, 2008a). Aktivace CDK5 u transgenních myší nadměrně exprimujících p25 zvyšuje tvorbu A β , naopak inhibice CDK5 produkci A β výrazně snižuje (Cruz *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008b). Inhibitory CDK5 mohou tedy u pacientů postižených Alzheimerovou chorobou zabránit tvorbě amyloidních plaků, patologii neurofibrilárních spleť a ztrátě synapsí (Monaco, 2004; Glicksman *et al.*, 2007).

Parkinsonova choroba (PD) postihuje především CNS a řadíme ji mezi nemoci napadající motorický systém. Během tohoto onemocnění dochází k redukci neuronů soustředěných v mozku v místě zvaném substantia nigra. Tyto neurony produkují neurotransmitter dopamin, jehož rolí je přenášet signály mezi jednotlivými neurony. Takto fungující dopaminergní systém je zodpovědný za celkové chování organismu, např. emoce, řídí systém hypotalamu, hypofýzy a funkci motorických neuronů v bazálních gangliích. Nedostatek dopaminu způsobuje postupnou a nevratnou ztrátu koordinace pohybů (Parkinsonova choroba podle článku Nadace Michaela J. Foxe pro výzkum Parkinsonovy choroby, Svršek J.: <http://natura.baf.cz/natura/2005/7/20050701.html>). Výzkum PD na myších modelech prokázal, že léčba 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MPTP) zvyšuje hladinu komplexu CDK5/p25 v dopaminergních neuronech, což vede k zániku neuronů (Smith *et al.*, 2003). Irreverzibilní příznaky PD jsou způsobeny právě léčbou

zprostředkovanou MPTP, která v části mozku zvané substantia nigra ničí dopaminergní nervové buňky. CDK5 fosforylací endophilinu B1 spouští autofagii (Wong *et al.*, 2011). Deregulace autofagie souvisí s patogenezí PD a k akumulaci autofagozómu dochází nejen v mozkové tkáni pacientů s Parkinsonovým onemocněním, ale i v myších PD modelech (Anglade *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2003).

3.2 Možnosti inhibice cyklin-dependentních kináz

Poruchy či jisté odchylky v expresi, aktivitě nebo regulaci CDK mají za následek různá virová, neurodegenerativní a rakovinová onemocnění. Tento fakt přiměl výzkumné týmy zaměřit se na studium malých molekul CDK inhibitorů, u kterých bylo dokázáno, že umí inhibovat aktivitu CDK a mají taktéž terapeutické využití (Cicenas & Valius, 2011). V současnosti se více než 20 látek nachází v různých fázích klinického testování (Kryštof & Uldrijan, 2010; Lapenna & Giordano, 2009) a počet nových CDKi neustále roste (Dai & Grant, 2003).

Každý inhibitor má jinou strukturu, avšak vlastnosti mají všechny inhibitory společné. Vyznačují se především nízkou molekulovou hmotností (<600) a plochou hydrofobní heterocyklickou molekulou (Hardcastle *et al.*, 2002). Mechanismy působení různých typů CDK inhibitorů jsou rozdílné a detailně jsou popsány níže. Jednak soutěží s ATP o vazebné místo, interagují s fosfothreoninem v tzv. T-kliče, mají vliv na vazbu s cykliny a zároveň na vazbu nízkomolekulárních proteinů, ovlivňují též aktivační fosfatázu cdc25, mimo to ještě napodobují interakci přirozených inhibičních proteinů, způsobují proteolýzu cyklinů, a tak dále (Meijer, 1996).

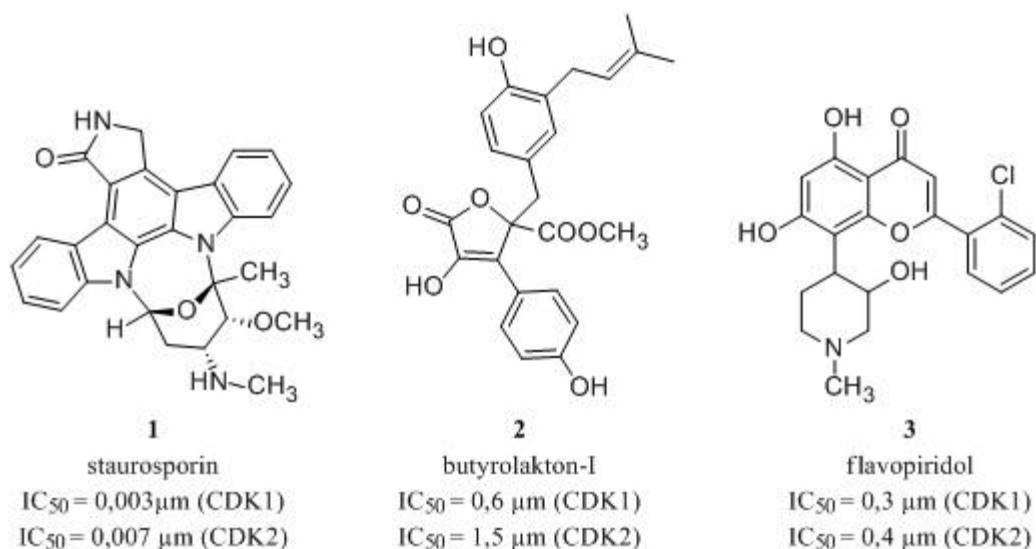
3.2.1 Stručný přehled inhibitorů CDK

Objev přirozených proteinových inhibitorů, tedy regulátorů aktivity CDK, úzce souvisí s následujícím vývojem a výzkumem inhibitorů chemických (Kryštof & Strnad, 2001). Ty lze rozdělit do dvou skupin na nespecifické a specifické. Mezi nespecifické inhibitory řadíme 6-dimethylaminopurin, dále produkt plísni rodu *Streptomyces* zvaný staurosporin a suramin, což je přirozený glykosaminoglykan, který má velmi rozmanité využití např. jako antiprozoikum, antihelmintikum, inhibitor topoisomery II a cytostatikum (Rialet & Meijer, 1991). Následujícím inhibitorem topoisomerasy je 9-hydroxyellipticin, nízké selektivní derivát alkaloidu z rostlin rodu *Ochrosia* (Ohashi *et al.*, 1995). Druhou skupinou jsou specifické inhibitory, jejichž členy jsou ku příkladu butyrolakton-I a olomoucín. Dalšími látkami inhibujícími CDK jsou flavonoidy,

trisubstituované puriny, paulony a indigoidní látky (Kryštof & Strnad, 2001). Vybraní zastupci budou podrobněji uvedeni níže.

Butyrolakton-I **1** byl vyseparován z plísně *Aspergillus* a je kompetitivním inhibitorem CDK1 vzhledem k ATP (Kitagawa *et al.*, 1993). Inhibuje též CDK2, avšak CDK4 ne. Tento inhibitor, navzdory jeho špatné propustnosti, vykazuje protinádorové účinky vůči mnoha buněčným liniím, jako je například rakovina plic, slinivky břišní či tlustého střeva (Noshio *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998).

Mezi flavony drží prvenství semisyntetický flavonoid a zároveň syntetický analog rohitukinu zvaný flavopiridol **2** (Tab. 2), též pod označením NSC 649890, L86-8275 nebo HMR 1275, izolovaný z kůry indické rostliny *Dysoxylum binectariferum* (Senderowicz, 2002; Sedláček *et al.*, 1996). Tato látka inhibuje CDKs účastnící se buněčného cyklu, a to CDK1 ($IC_{50}=30nM$), CDK2 ($IC_{50}=100nM$), CDK4 ($IC_{50}=20nM$), CDK6 ($IC_{50}=60nM$), CDK7 ($IC_{50}=10nM$) a CDK9 ($IC_{50}=10nM$), která má důležitou roli v transkripci mRNA a fosforylaci RNA polymerázy II (Kaur *et al.*, 1992). Flavopiridol je známý především tím, že se stal prvním inhibitorem CDK, který byl zahrnut do klinického testování (Whitlock *et al.*, 2005; Phelps *et al.*, 2009; Blum *et al.*, 2010). Podstoupil II fázi klinických studií týkající se léčby akutní myeloidní a chronické lymfocytární leukémie. Bylo prokázáno, že současné podání této inhibující látky spolu s jinou cytotoxickou látkou, jako je třeba docetaxel či cisplatin, snižuje množství flavopiridolu a jeho nežádoucích vedlejších účinků (Diaz-Padilla *et al.*, 2009; Abate *et al.*, 2013). Následně byla vyvinuta i druhá generace flavonů, do níž řadíme inhibitor P276-00 **3**. Ten účinně inhibuje CDK1 ($IC_{50}=79nM$), CDK2 ($IC_{50}=224nM$), CDK4 ($IC_{50}=63nM$) a CDK9 ($IC_{50}=20nM$) a ve srovnání s flavopiridolem představuje vyšší antiproliferační aktivitu v různých nádorových liniích. Momentálně se látka P276-00 (Tab. 2) nachází ve II fázi klinických studií zaměřených na léčbu nádorů nadměrně exprimujících cyklin D, mezi které patří lymfom z plášťových buněk, mnohočetný myelom a melanom (Joshi *et al.*, 2007a; Joshi *et al.*, 2007b; De Azevedo *et al.*, 1996; Murthi *et al.*, 2000).

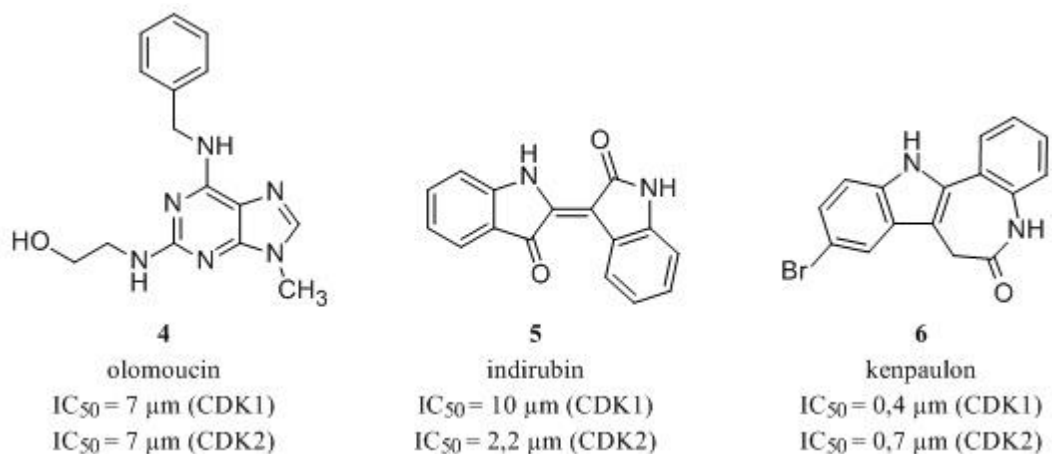


Obr. 2: *Struktury vybraných CDK inhibitorů.*

Jednou z prvních látek s prokázanou CDK inhibiční aktivitou je derivát 2,6,9-trisubstituovaného purinu, olomoucín **4**. Objev CDK inhibičních vlastností olomoucínu podnítil systematické studium vztahu mezi strukturou a účinkem v řadě 2,6,9-trisubstituovaných purinových derivátů a později také v analogických řadách bioisosterních heterocyklických jader. Podrobněji je této problematice věnována část 3.3. (Veselý *et al.*, 1994).

Do rodiny indigoidních látek řadíme tzv. Indirubiny **5** (Hoessel *et al.*, 1999), u nichž bylo po klinickém testování zjištěno, že jsou jen málo toxické, nemají téměř žádné nežádoucí účinky a vykazují 26% remisi u odlišných typů leukémií (Cooperative Group of Chemical Therapy of Indirubin, 1980). Kompetitivně inhibují CDK1/2 a 4 (Kryštof & Strnad, 2001).

Paulony jsou taktéž velmi účinnými a specifickými inhibitory CDK. Jsou to hlavně látky odvozené od derivátů 7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]-benzazepinu, jejichž nejvýznamějším představitelem je právě kenpaullon **6** (Zaharevitz *et al.*, 1999). Kenpaullon (neboli NSC 664704) slouží k inhibici CDK1 s hodnotou $IC_{50}=0,4 \mu\text{m}$, CDK2 s $IC_{50}=0,7 \mu\text{m}$, CDK 5 s $IC_{50}=0,9 \mu\text{m}$ a o něco hůře inhibuje CDK4 $IC_{50} > 100 \mu\text{m}$. Mimo CDK1,2,5 inhibuje i GSK-3 β . Navzdory tomu, že jde o komerčně dostupný inhibitor jeví se jako použitelný při výzkumu, nikdy nebyl podroben klinickému testování (Cicenas & Valius, 2011).

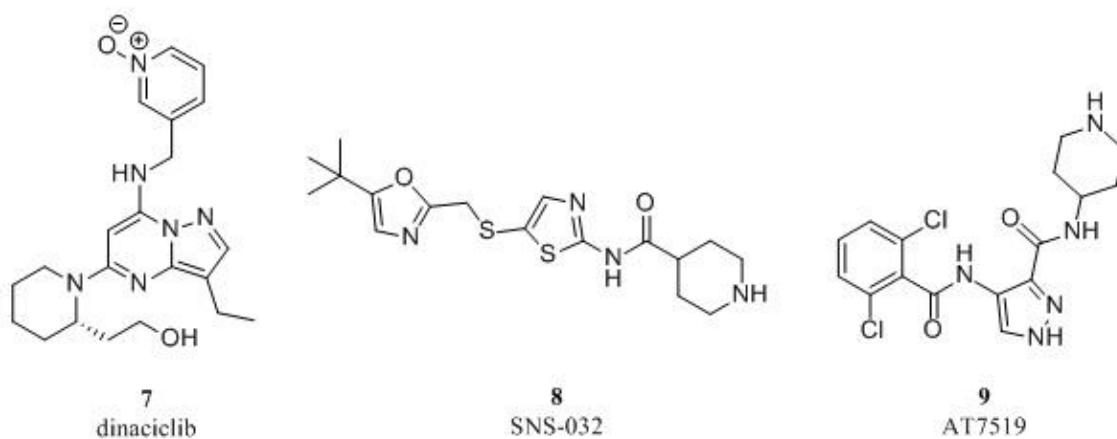


Obr. 3: Struktura olomoucínu, indirubínu a kenpaulonu.

Pyrimidinový derivát dinaciclib **7** (Tab. 2), také známý jako SCH727965 nebo MK-7965, je účinným inhibitorem CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 in vitro s hodnotami 50% inhibiční koncentrace (IC₅₀) v nanomolárním rozmezí 1-4nM (Paruch *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2010; Feldmann *et al.*, 2011; Mita^a *et al.*, 2014). Tato sloučenina umí inhibovat transkripci apoptotických proteinů, zároveň migraci, růst a vznik kolonií nejen pankreatických nádorových buněk, ale i řady dalších nádorů, které se tvoří v lidském těle. Zmíněný léčivý kandidát, který byl zahrnut do klinického testování solidních a hematologických malignit spolu s rakovinou prsu, se v současné době nachází ve III fázi klinických studií zaměřených na pacienty s chronickou lymfocytární leukémií CLL (Paruch *et al.*, 2010; Parry *et al.*, 2010; Feldmann *et al.*, 2011).

Látka skrývající se pod značením SNS-032 **8** (Tab. 2), dříve BMS-387032, inhibuje CDK2 (IC₅₀ > 0,038μm), CDK7 (IC₅₀ > 0,062μm) a CDK9 (IC₅₀ > 0,004μm) (Heath *et al.*, 2008). Díky svým protinádorovým účinkům byl inhibitor SCN-032 zařazen do první fáze klinických zkoušek u hematologických malignit (jako je např. chronická myeloidní – CML či lymfocytární leukémie – CLL) a různých solidních nádorů (Chen *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2010).

Sloučenina AT7519 **9** (Tab. 2) selektivně inhibuje CDK1 (IC₅₀=190nM), CDK2 (IC₅₀=44nM), CDK4 (IC₅₀=67nM), CDK5 (IC₅₀=18nM) a CDK9 (IC₅₀<10nM) (Mariaule & Belmont, 2014). První fáze klinického testování byla věnovala léčbě solidních nádorů, nyní se látka AT7519 nachází ve II. fázi klinických studií, která jsou soustředěna na pacienty s mnohočetnými myelomy (Mahadevan *et al.*, 2011).



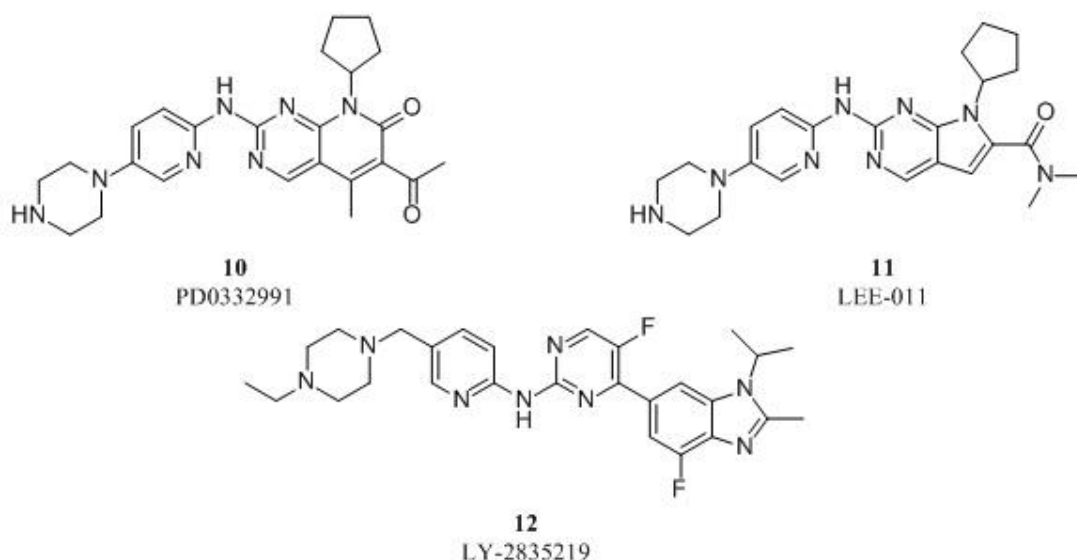
Obr. 4: Struktura dinaciclibu, SNS-032, AT7519.

Další inhibitor, který se jeví jako vhodný při léčbě rakoviny, je označen zkratkou PD0332991 **10** (Tab. 2) (Fry *et al.*, 2004). Jde o látku s vysokou inhibiční schopností pro CDK4 ($IC_{50}=11nM$) a CDK6 ($IC_{50}=16nM$), avšak s nulovou inhibiční aktivitou k ostatním 36 proteinovým kinázám (Fry *et al.*, 2004). U PD0332991 byl zjištěn antiproliferační efekt proti Rb-pozitivním nádorovým buňkám, které jsou zodpovědné za pozastavení buněčného cyklu v G1 fázi a za snížení fosforylace retinoblastoma proteinu (Niesvizky *et al.*, 2010). Tato látka, známá též pod názvem palbociclib, se v první fázi klinických studií projevila nadějnou klinickou účinností a dobrou tolerancí profilové toxicity u pacientů s RB-pozitivními a pokročilými stádii solidních nádorů a non-Hodgkinova lymfomu (Schwartz *et al.*, 2011). Mimo to PD0332991 vykazuje pozitivní výsledky testů prováděných na pacientech s lymfomem z plášťových buněk, mnohočetným myelomem v kombinaci s léky bortezomibem a dexamethasonem a karcinomem prsu v kombinaci s letrozolem. Nyní se nachází ve II. či III. fázi klinických zkoušek zaměřených na rakovinu prsu, liposarkom a lymfom z plášťových buněk (Misra *et al.*, 2004).

Konkurence schopným drug-kandidátem palbociclibu se zdá být látka s označením LEE-011 **11** (Tab. 2), která je nejen strukturně velmi podobná inhibitoru PD0332991, jejich podobnost však spočívá především ve vysoké selektivitě k CDK4 a CDK6. Díky povzbudivým výsledkům byla tato sloučenina zahrnuta do třetí fáze klinického testování pro léčbu rakoviny prsu (Kurt, 2014).

LY-2835219 **12** (Tab. 2), neboli abemaciclib, také selektivně inhibuje CDK4 a CDK6. Abemaciclib byl zařazen do první fáze klinických studií pro léčbu

nemalobuněčného karcinomu plic a kladné výsledky projevily i u studií léčby rakoviny prsu (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02057133?term=LY2835219&rank=5>, na základě čehož se momentálně nachází v kombinaci s lékem fulvestrantem ve III. fázi zkoušek zaměřených na léčbu žen s HER2-negativním metastazujícím karcinomem prsu (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02107703?term=LY2835219&rank=9>).



Obr. 5: Struktura PD0332991, LEE-011, LY-2835219.

EM-1421 **13** (Tab. 2), jiným názvem terameprocol, inhibuje CDK1 (Smolewski, 2008) a je zařazen do I/II fáze klinických studií, která jsou věnována léčbě refrakterních solidních nádorů (Galons *et al.*, 2013).

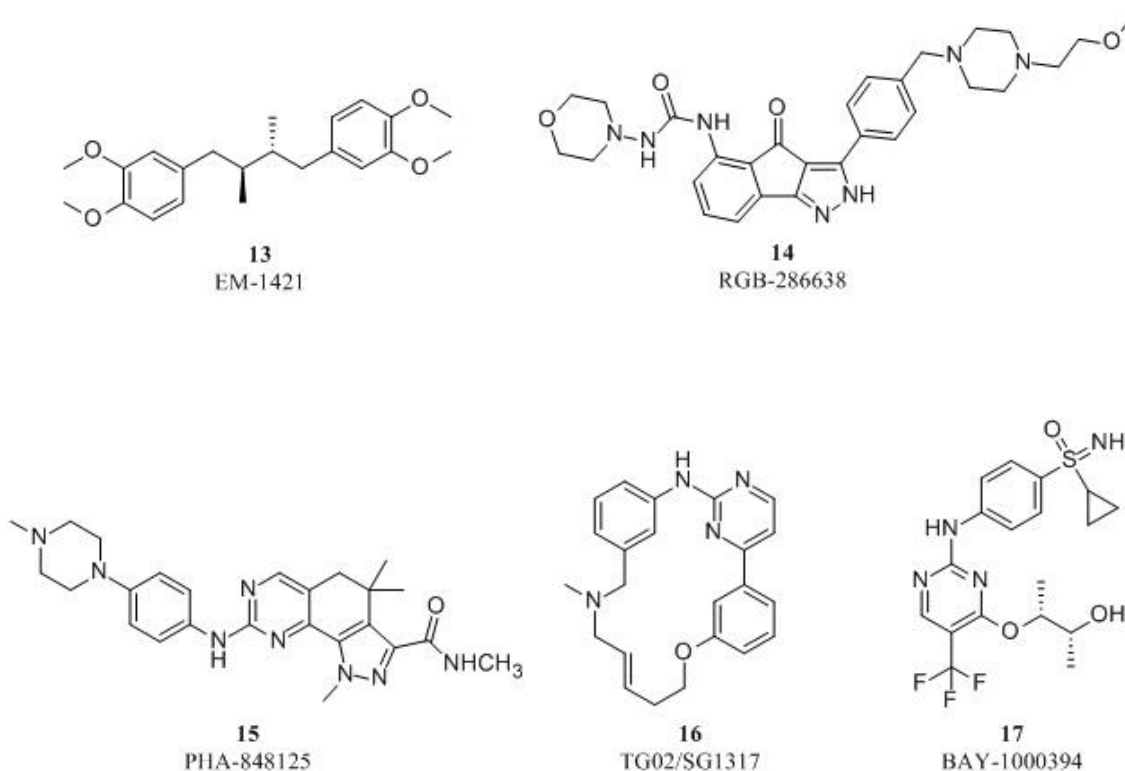
RGB-286638 **14** (Tab. 2) je účinným inhibitorem CDK1-4 a CDK9 s IC_{50} v rozmezí 1-5nM. Byla dokončena pouze první fáze klinického vývoje této látky na pacientech s mnohočetnými myelomy (Cirstea *et al.*, 2013).

PHA-848125 **15** (Tab. 2), též milciclib, selektivně inhibuje CDK1 (IC_{50} =2nM), CDK2 (IC_{50} =3nM) a CDK4 (IC_{50} =5nM), v současnosti je ve II. fázi klinického testování pro léčbu karcinomu thymu (brzlíku) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01011439>) a nedávno byl dokonce patentován k léčbě mezoteliomu (WO 2010/058006 A1).

Pyrimidinový derivát TG02/SG1317 **16** (Tab. 2) *in vitro* inhibuje CDK1 (IC_{50} =9nM), CDK2 (IC_{50} =5nM), CDK3 (IC_{50} =8nM), CDK5 (IC_{50} =4nM) a CDK9 (IC_{50} =3nM), nese

zodpovědnost za pozastavení buněčného cyklu v G1 fázi a indukuje apoptózu v mnoha nádorových buněčných liniích (Goh et al., 2012). TG02/SG1317 byl začleněn do první fáze klinické studie u pacientů s akutní myeloidní (AML) a akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), chronickou lymfocytární leukémií, myelomem a myelodysplastickým syndromem (Roboz *et al.*, 2012).

Látka BAY-1000394 **17** (Tab. 2) inhibuje CDK1-4, která jsou zapojena do buněčného cyklu a zároveň CDK7 a CDK9, která mají svůj podíl na regulaci transkripce s hodnotami IC_{50} =5-25nM (Mariaule & Belmont, 2014). Tento pan-selektivní inhibitor potvrdil svou aktivitu proti řadě různých lidských nádorových linií při *in vivo* experimentech na myších modelech a momentálně se nachází v rané fázi klinického vývoje (Siemeister *et al.*, 2012).



Obr. 6: Struktury látek EM-1421, RGB-286638, PHA-848125, TG02/SG1317, BAY-1000394.

Tabulka 2: Přehled CDK inhibitorů nacházejících se v klinickém testování.

Zkoušené léčivo	Způsob podávání	CDK inhibiční profil: IC ₅₀	Fáze klinického testování
Roskovitin	orálně	CDK1=2,7μM CDK2=0,1μM CDK7=0,5μM CDK9=0,8μM	II
Flavopiridol	intravenózně	CDK1=30nM CDK2=100nM CDK4=20nM CDK6=60nM CDK7=10nM CDK9=10nM	II
P276-00	intravenózně	CDK1=79nM CDK2=224nM CDK4=63nM CDK9=20nM	II
Dinaciclib	intravenózně	CDK1=3nM CDK2=1nM CDK5=1nM CDK9=4nM	III
SNS032	intravenózně	CDK2=38nM CDK7=62nM CDK9=4nM	I
AT7516	intravenózně	CDK1=190nM CDK2=44nM CDK4=67nM CDK5=18nM CDK9<10nM	I/II
PD0332991	orálně	CDK4=11nM CDK6=16nM	III
LEE-011	orálně	CDK4,6=N/A	III
LY2835219	orálně	CDK4,6=N/A	I/(III)
EM-1421	intravenózně	CDK1=N/A	I/II

Tabulka 2: *Přehled CDK inhibitorů nacházejících se v klinickém testování. (pokračování)*

RGB-286638	intravenózně	CDK1=2nM	I
		CDK2=3nM	
		CDK3=5nM	
		CDK4=4nM	
		CDK9=1nM	
PHA-848125AC	orálně	CDK1=2nM	II
		CDK2=3nM	
		CDK4=5nM	
		CDK5=4nM	
TG02/SG1317	orálně	CDK1=9nM	I
		CDK2=5nM	
		CDK3=8nM	
		CDK5=4nM	
		CDK9=3nM	
BAY-1000394	orálně	CDK1-4,7,9=5-25nM	I

3.2.2 Terapeutický potenciál CDK inhibitorů ve vztahu k selektivě k CDK

Inhibitory CDKs lze rozdělit do tří skupin na: za a) neselektivní pro nespecifickou CDK (př. flavopiridol, oxindol 16 a 91), za b) inhibující CDK1,2,5, respektive 9 (př. olomoucín, (R)-roskovitin, purvanol B) a za c) selektivní pro CDK4 a 6 (jako je například fascaplysin, CINK4, PD0183812 a další) (Honma *et al.*, 2001a; Honma *et al.*, 2001b). Doposud nebyla nalezena žádná látka inhibující CDK, která by byla úplně selektivní pro jednu CDK. Vědci však dále hledají vhodné přírodní látky či struktury na bázi syntetických sloučenin, které jsou selektivní pro danou CDK, konkrétně pro CDK1,2 a 4 (Sausville *et al.*, 2002).

Bylo zjištěno, že inhibitory CDK mají v současnosti uplatnění nejen při léčbě nádorových onemocnění, ale i dalších, např. virových infekcí, neurodegenerativních a kardiovaskulárních chorob, glomerulonefritidy, onemocnění vyvolaných jednobuněčnými parazity, atd. (Knockaert *et al.*, 2002).

Glomerulonefritida se v nefrologii často projevuje proliferací glomerulárních buněk vedoucí k nesprávné funkci ledvin a vzniku zánětu (Shankland, 1997). Inhibitor CDK Roskovitin umí *in vivo* inhibovat tuto nekontrolovatelnou proliferaci a tím zlepšit či obnovit funkce ledvin (Pippin *et al.*, 1997).

Kardiovaskulární onemocnění, které je charakterizováno abnormálním růstem vaskulárních buněk, obvykle souvisí s dalšími chorobami, jako je ateroskleróza, post-angioplastická restenóza, a další (Braun-Dullaes *et al.*, 1998). Inhibitory CDK tlumí proliferaci těchto buněk. Konkrétně analog Olomoucínu a Roskovitinu – látka CVT-313 se u krys jeví jako vhodný *in vivo* inhibitor bujení neointimálních buněk (Brooks *et al.*, 1997).

Zodpovědnost za mnoho celosvětově rozšířených nemocí nesou právě jednobuněční parazité. Mezi ně řadíme např. prvoky *Trypanosoma brucei* (původce spavé nemoci), *Plasmodium falciparum* (způsobující malárii), *Leishmania major* (vyvolávající nemoc leishmaniózu) a *Toxoplasma gondii* (která je příčinou vzniku choroby zvané toxoplazmóza). Zmíněné mikroorganismy vykazují podobnost s lidskými CDKs, jde o tzv. CRK (Cdc2 – related kinases). Parazitální CRK sdílí spolu s lidskou CDK 40-60% homologii (Doerig *et al.*, 2002). Odlišnosti ve struktuře mezi hostitelskou a parazitální CDK mohou mít za následek různou afinitu inhibujících látek. Řada sloučenin syntetizovaných pro studium vztahu struktury a aktivity savčích inhibitorů CDK představuje významné zdroje pro výzkum CRK-selektivních inhibitorů. Tento postoj by následně mohl být rozšířen o další třídy parazitů, a to mnohobuněčné parazity či houby (př. hlísty, hlístice a jiné). I přes to, že některé lidské inhibitory projeví účinek k dané CRK se předpokládá možnost nalezení parazitálních CDK specifických inhibitorů. Nedávno byla PfCK1 identifikována jako hlavní složka purvalanolu, která se nachází u prvoka *Plasmodium falciparum* (Knockaert *et al.*, 2000).

Jistá skupina účinných inhibitorů CDK vykazuje i možné uplatnění v neurologii. Dosud neznámým způsobem dokáží tyto látky inhibovat buněčnou smrt nervových buněk (Park *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 1997). CDK5 je ve spojení s proteinem p35 zodpovědná za hyperfosforylaci mikrobubulární vazby tau proteinu v mozku u lidí trpících Alzheimerovou chorobou (Imahori & Uchida *et al.*, 1997). Při Alzheimerově chorobě se projevuje také komplex CDK1/cyklin B (Vincent *et al.*, 1997).

Virová replikace probíhá obvykle v souladu s buněčným cyklem. Pro spuštění replikace vyžaduje řada virů aktivaci CDKs, některé viry dokonce kódují své vlastní cykliny, což jim umožňuje regulovat buněčný cyklus hostitelské buňky. Jako vhodné látky pro zamezení virové replikace *in vitro* se v posledních letech osvědčily inhibitory CDK (Schang, 2001). Např. inhibitor Roskovitin je schopen zabránit replikaci lidského cytomegaloviru a podobný účinek se projevuje i u CDK2 dominantní negativní mutace (Bresnahan *et al.*, 1997). Olomoucín a Roskovitin též brání replikaci herpes simplex viru (HSP) (Schang *et al.*, 1998). Roskovitin spolu s Flavopiridolem inhibují transkripci viru HIV. Tento jev může být způsoben inhibicí CDK9/cyclin T1, kde buněčný kofaktor vyžaduje pro HIV-1 transaktivátor Tat (Nelson *et al.*, 2001).

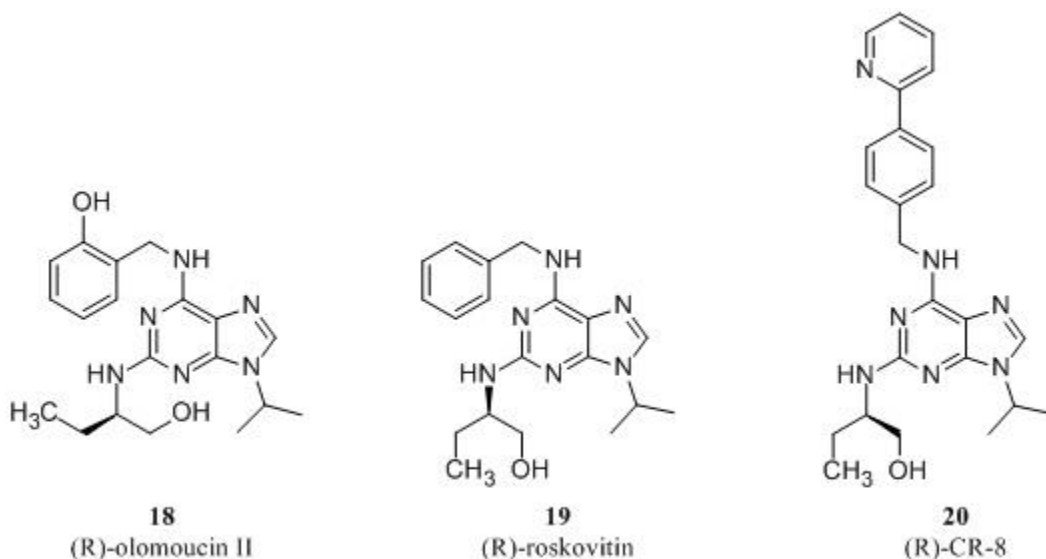
3.3 CDK inhibitory 2,6,9-trisubstituované purinové řady

Dlouholetá studie purinových derivátů, odvozených od rostlinných hormonů cytokininů, vyústila v objev 2,6,9-trisubstituovaných purinů, které odhalily existenci mnoha vysoce aktivních inhibitorů CDK (Veselý *et al.*, 1994).

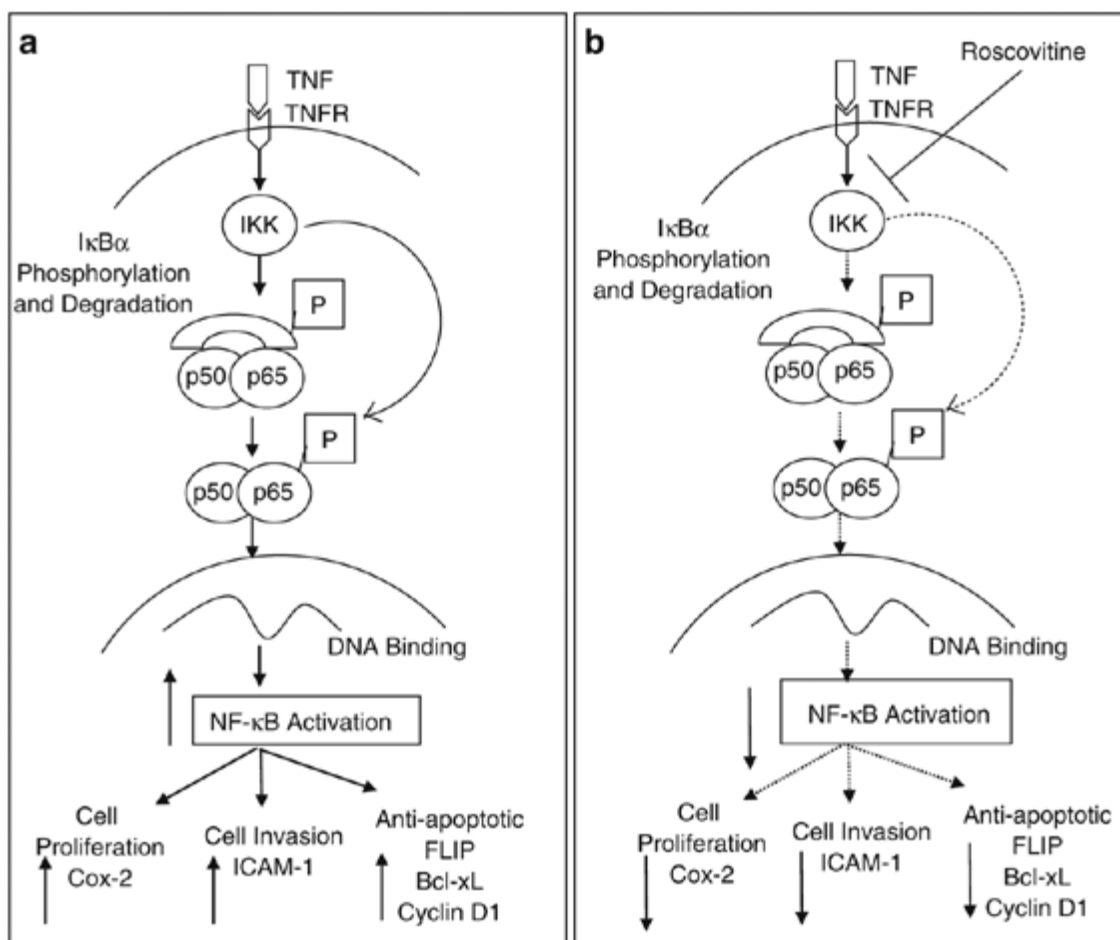
Jedním z prvních inhibitorů této purinové řady byl 2-hydroxyethylamino-6-benzylamino-9-methylpurin, Olomoucín (Meijer & Raymond, 2003). Olomoucín selektivně inhibuje CDK1 ($IC_{50} = 7 \mu\text{M}$), CDK2 ($IC_{50} = 7 \mu\text{M}$), CDK5 ($IC_{50} = 3 \mu\text{M}$) a ERK1 kinázu ($IC_{50} = 25 \mu\text{M}$). Nebyl však podroben klinickým zkouškám (Cicenas & Valius, 2011).

Dalším významným inhibitorem z této skupiny byl 2-(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin s pozdějším označením Roskovitin **19**. Pro jeho R- enantiomer (R-roskovitin) se často používají i jiné názvy, jako CYC-202 či Seliciclib. Podobně jako Olomoucín inhibuje CDK1,2 a 5, navíc ještě CDK 7 s hodnotou $IC_{50} = 0,2-0,5 \mu\text{M}$ (Cicenas & Valius, 2011; Meijer & Raymond, 2003). Jeho antiproliferační aktivita souvisí s defosforylací pRb a snížením regulace CDK a regulačních podjednotek - cyklínů (Barrie *et al.*, 2003; MacCallum *et al.*, 2005; Paprskářová *et al.*, 2009; Raynaud *et al.*, 2005; Whittaker *et al.*, 2004). Potlačuje transkripci genů, které brání apoptóze, což může zlepšit jeho protinádorovou aktivitu (Alvi *et al.*, 2003; Hahntow *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; MacCalum *et al.*, 2004). V současnosti se roskovitin nachází v preklinické fázi testů u polycystických ledvinových onemocnění (Bukanov *et al.*, 2006), mrtvice, Alzheimerovy choroby (příprava) (Menn *et al.*, 2008) a zánětů (Rossi *et al.*, 2006). V první fázi je hodnocen na různých onemocněních ledvin (glomerulonefritida) (Bukanov *et al.*, 2006) a ve II fázi

klinického testování se nachází u pacientů s diagnózou rakoviny nosohltanu, nemalobuněčného karcinomu plic (Hsieh *et al.*, 2009) nebo jiných typů nádorů (Le *et al.*, 2010). Pro další terapeutické využití však může být omezující jeho krátký biologický poločas, slabší účinnost či poměrně rychlý metabolismus (Obr. 8) na neaktivní deriváty (Nutley *et al.*, 2005; Bettayeb *et al.*, 2008a; Bettayeb *et al.*, 2010).



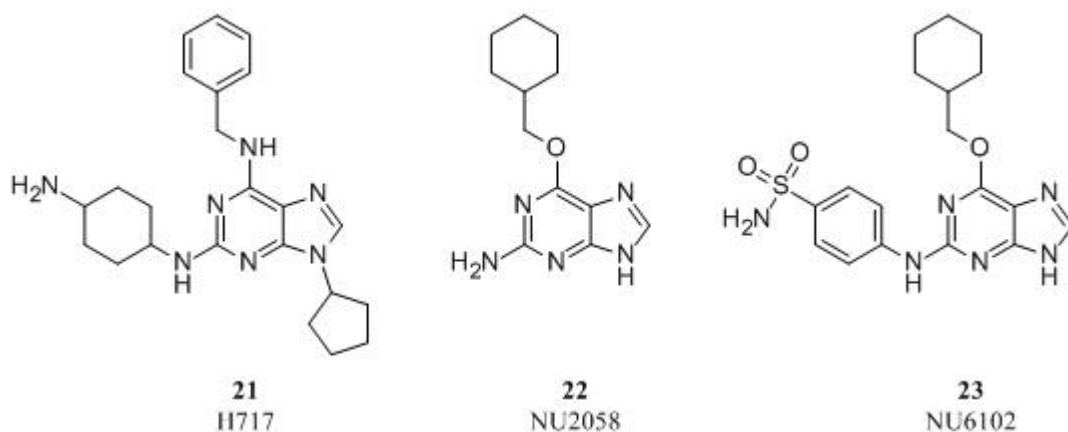
Obr. 7: Struktura (R)-olomoucinu II, (R)-roskovitinu a (R)-CR-8.



Obrázek 8: Model mechanismu působení R-roskovitinu a jeho inhibice NF- κ B dráhy. (a) Kanoická TNF- α indukovaná NF- κ B aktivační drahou. (b) R-roskovitinová inhibice TNF-indukované fosforylace a degradace I κ B α (znázorněno čárkovně). Vzhledem k tomu, že se I κ B vázaný na p63 nemění a díky R-roskovitinem zprostředkované inhibici IKK bloků její činnosti, je i fosforylace proteinu p65 na serinu 536 ovlivněna touto léčbou. Léčba R-roskovitinem nakonec brání nukleární lokalizaci p65, čímž snižuje regulaci dráhy NF- κ B a jeho různých genových produktů, které jsou zapojeny do invaze buněk, buněčné proliferace a antiapoptózy (Dei et al., 2008).

Úspěšnost Roskovitinu inspirovala k dalšímu vývoji podobných derivátů purinových CDK inhibitorů korelujících s optimalizací substituentů v daných pozicích purinového jádra, dále se záměnou uhlíku za dusík nebo přidáním dusíku způsobující změnu heterocyklického skeletu purinu a s kombinací obou již zmíněných. Byla připravena řada vysoce účinných purinových inhibitorů, mezi které patří např. sloučenina s názvem Purvalanol A (Chang et al., 1999; Gray et al., 1998), dále H717 (Dreyer et al., 2001) **21**,

NU2058 **22** a NU6102 **23** (Davies *et al.*, 2002; Hardcastle *et al.*, 2004), CR8 (Bettayeb *et al.*, 2008a), 3-chloranilino deriváty (Oh *et al.*, 2001) a také 6-biaryl, resp. heterobiaryl substituované deriváty (Oumata *et al.*, 2008; Trova *et al.*, 2009a; Trova *et al.*, 2009b). Některé z těchto purinových sloučenin vykazují minimálně stonásobně vyšší selektivitu než Roskovitin (Jorda *et al.*, 2012).

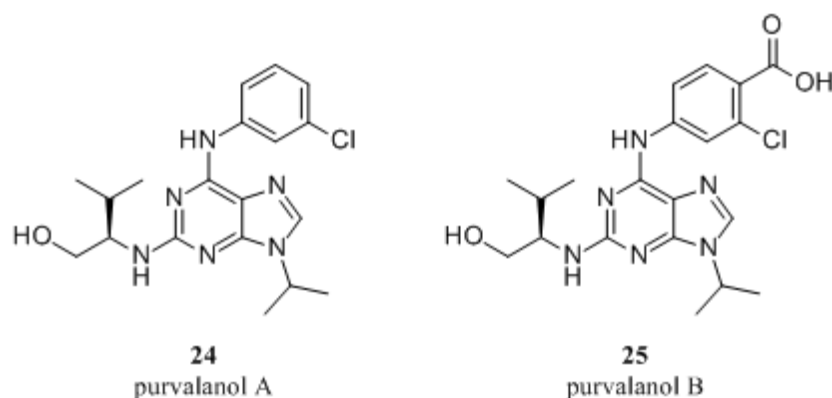


Obr. 9: Struktura H717, NU2058, NU6102.

CR-8 **20** patří mezi biarylové deriváty roskovitinu substituované v pozici N6 (Bettayeb *et al.*, 2008a). Látka selektivně inhibuje CDK1, 2, 5, 7, 9 a při inhibici těchto kináz jsou oba její izomery 2-4 krát účinnější než R-roskovitin. Inhibuje také kasein kinázu 1 (CK1) δ/ϵ a GSK-3 α/β (Bettayeb *et al.*, 2008a). V preklinické fázi testování traumatického poškození mozku bylo zjištěno, že snižuje ztrátu neuronů v kůře, hipocampu a thalamu, a také kladně působí na snížení objemu lézí (Kabadi *et al.*, 2014).

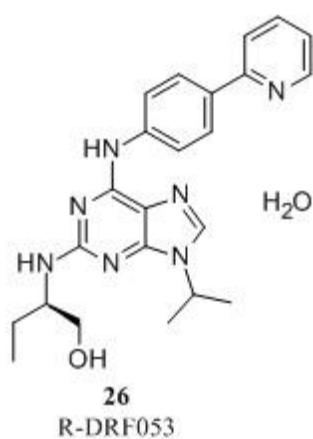
Purvalanol A **24** je 1000 krát účinnější inhibitor než Olomoucín. [18] Stejně jako u Olomoucínu a Roskovitinu byla také u této látky popsána krystalová struktura kokrystalu s CDK2 (Gray *et al.*, 1998; Kryštof & Strnad, 2001). Projevuje vysokou selektivitu k CDK2 (IC_{50} = 4-70 nm) a CDK5 (IC_{50} = 75 nm), naopak méně inhibuje CDK4 (IC_{50} = 850 nm). Purvalanol B **25** je stejně jako Purvalanol A selektivní pro CDK2 (IC_{50} = 6-9 nm), CDK5 (IC_{50} = 6 nm), navíc inhibuje ještě CDK1 s (IC_{50} = 6 nm) a je neselektivní k CDK4/6 a ostatním kinázám (IC_{50} > 10000) (Cicenas *et al.*, 2014). Purvalanol A spolu s Olomoucínem II **18**, látkou podobně účinnou spadající taktéž do skupiny nových 2,6,9-trisubstituovaných purinových inhibitorů odvozených od

Roskovitinu, dokáží blokovat transkripci esenciálních genů, zabránit proliferaci buněk a indukovat apoptózu (Kryštof *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 1998; Kryštof *et al.*, 2005; Villerbu *et al.*, 2002; Monaco *et al.*, 2004). Purvanol A nebyl nikdy podroben klinickému testování (Cicenas & Valius, 2011).



Obr. 10: Struktura Purvalanolu A a Purvalanolu B.

Do série biarylamino derivátů odvozených od roskovitinu řadíme látku s označením R-DRF053 **26**. Jde o velmi silný ATP kompetitivní inhibitor CDK1/cyclin B ($IC_{50} = 220$ nm), CDK5/p25 ($IC_{50} = 80$ nm) a CK1 ($IC_{50} = 14$ nm). Díky inhibici CK1 a CDK5 představuje možné uplatnění při léčbě zejména Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Oumata *et al.*, 2008).



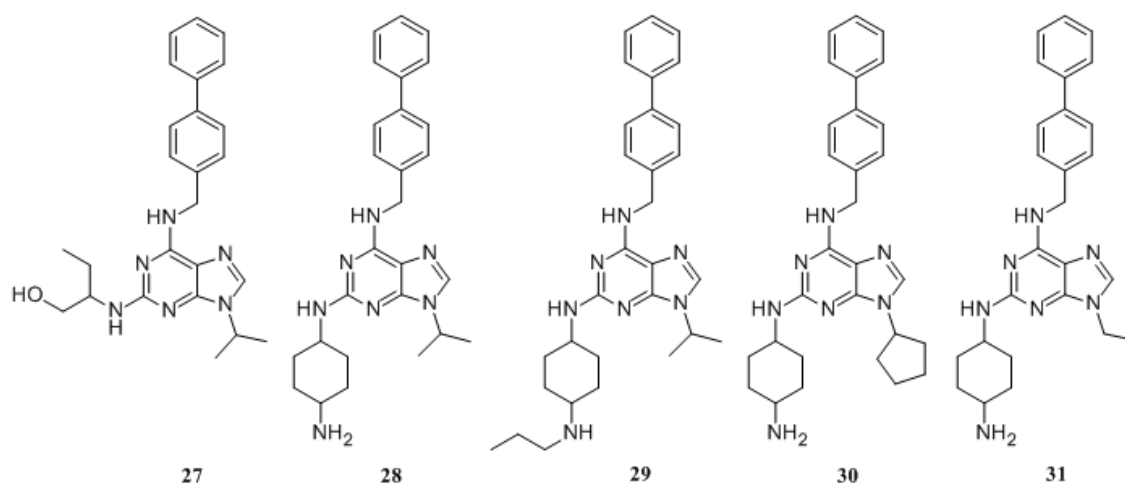
Obr. 11: Struktura R-DRF053.

Navázáním biarylmethylamino skupiny na purinovou kostru do polohy C6 vznikne látka **27** s CDK inhibiční schopností podobnou Roskovitinu, avšak s ještě vyšší antiproliferační aktivitou (vykazuje 50x větší růstovou inhibici Hela buněk). Pozitivní účinky této látky rozpoutaly další systematické studie vztahu struktury a aktivity purinových sloučenin, jejichž součástí je právě biarylmethylamino skupina substituovaná v pozici C6 (Trova *et al.*, 2009b).

Nejlepší výsledky týkající se inhibice CDK a růstu Hela buněk se projeví u látky **28** s trans-1,4-aminocyklohexylamino skupinou v poloze C2, bifenylylmethylamino skupinou v C6 a s isopropylem vázaným na purinovém jádře v místě N9. Ta představuje dokonce 5krát vyšší antiproliferační účinky než látka **27** (Trova *et al.*, 2009b; Malínková, 2013).

Díky vysoké antiproliferační aktivitě látky **28** ($GI_{50} = 0,077 \mu\text{m}$) byly derivatizací distální aminoskupiny vytvořeny další její deriváty. Jako poměrně účinná se projevila látka **29** s téměř shodnými antiproliferačními účinky, jako má látka **28**. Následně byly studovány látky s trans-1,4-aminocyklohexylamino skupinou v poloze C2, p-bifenylylmethylamino skupinou v C6 a různou alkylovou skupinou navázanou v pozici N9. Pozitivní výsledky v inhibici CDK2/cyklin E byly prokázány u látky **30** s inhibiční hodnoutou ($IC_{50} = 0,09 \mu\text{m}$) (Trova *et al.*, 2009b).

Ze série těchto látek substituovaných v poloze N9 vykazuje N-ethylový analog (látka **31**) podobnou antiproliferační aktivitu jako N-isopropyllový derivát **28** (Obr. 12 a Tab. 3) (Trova *et al.*, 2009b; Malínková, 2013).



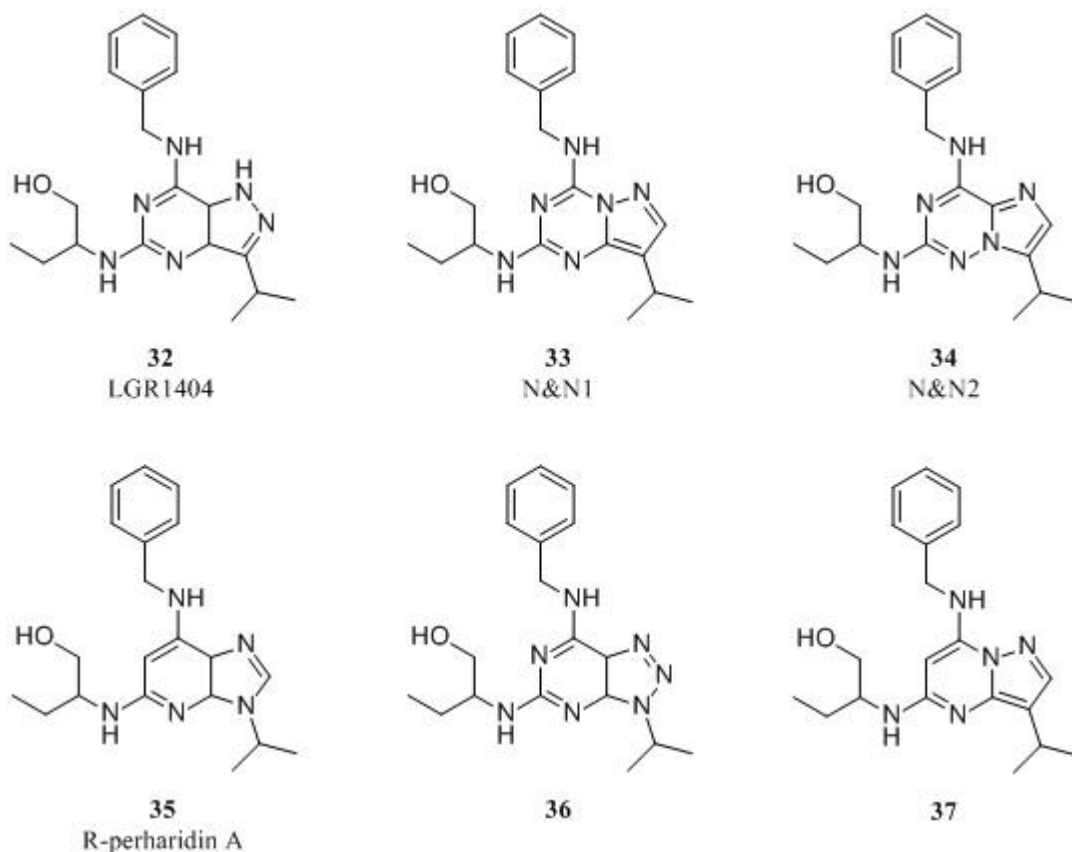
Obr. 12: Struktury vybraných biarylmethylamino látek odvozených od roskovitinu.

Tabulka 3: Porovnání IC_{50} CDK2 a GI_{50} roskovitinu s vybranými biarylmethylamino deriváty roskovitinu **19** (Trova *et al.*, 2009b).

Sloučenina	CDK2/cyc A IC_{50} v μ M	CDK2/cyc E IC_{50} v μ M	Hela IC_{50} v μ M
19	0,46	0,52	20
27	2	0,6	0,4
28	0,4	0,1	0,077
29	0,5	0,4	0,097
30	0,1	0,09	0,4
31	-	-	0,048

Složitější proces syntetické obměny purinové kostry započal vývoj purinových bioisosterů (Jorda *et al.*, 2012). Jde především o strukturně velmi podobné látky, které se však mohou lišit vzájemným uspořádáním atomů v molekule, případně některými atomy či funkčními skupinami. Právě syntetické modifikace mohou způsobit příznivou změnu vlastností látek, např. snížení (eliminaci) určitých negativních vlivů, zlepšení metabolické stability léčiv, biologické dostupnosti a farmakokinetiky (Popowycz *et al.*, 2009). Bioizostery se dělí podle počtu dusíků obsažených v purinovém jádře na a) čtyřdusíkaté (největší skupina), b) dvoudusíkaté, c) třídusíkaté a d) pětídusíkaté (nejmenší skupina) (Jorda *et al.*, 2012).

Byly však popsány pouze 4 třídy nejúčinnějších bioisosterů, a to pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triaziny (Bettayeb *et al.*, 2008b; Popowycz *et al.*, 2009; WO 2005/082908 A1), pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny (Paruch *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2005), pyrazolo[1,5-a]pyridiny (Fischmann *et al.*, 2008) a pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny (Jorda *et al.*, 2011; Kryštof *et al.*, 2006). Celkem bylo připraveno a biologicky testováno jen 6 roskovitinových bioisosterů (Obr. 13 a Tab. 4), mezi něž patří LGR1404 **32** (z pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů) (Jorda *et al.*, 2011), N&N-1 **33** (z řady pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů), N&N-2 **34** (z imidazo[2,1-f]-1,2,4-triazinů) (Bettayeb *et al.*, 2008b; Popowycz *et al.*, 2009), dále R-perharidin A **35** (z imidazo[4,5-a]pyrimidinů) (WO 2009/034411 A1), látka **36** (spadající do skupiny 8-azapurinů) (Havlíček *et al.*, 2005) a **37** (z pyrazolo[1,5-a]pyrimidinů) (WO 2008/151304 A1).



Obr. 13: *Struktury vybraných roskovitinových bioisosterů.*

Tabulka 4: *Inhibiční aktivita CDK2 vybraných roskovitinových bioisosterů (Jorda et al., 2011; Bettayeb et al., 2008b; Popowycz et al., 2009; WO 2009/034411 A1; Havlíček et al., 2005; WO 2008/151304 A1).*

Bioisosterická skupina	sloučenina	číslo	CDK2/cyc A IC ₅₀ v μM	CDK2/cyc E IC ₅₀ v μM
pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny	LGR1404	32	-	0,04
pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triaziny	N&N1	33	0,04	0,026
imidazo[2,1-f]-1,2,4-triaziny	N&N2	34	0,22	0,16
imidazo[4,5-a]pyrimidiny	R-perharidin A	35	0,3	0,18
8-azapuriny	-	36	>1	-
pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny	-	37	-	4,1

3.3.1 Vztah mezi strukturou a účinkem CDK inhibitorů 2,6,9-trisubstituované purinové řady

Mnoho purinových analog je substituovaných v C2 poloze hydroxyethylamino či aminoethylamino skupinou (Imbach *et al.*, 1999). Odstraněním 2-hydroxyethylamino skupiny z místa C2 se sníží inhibiční aktivita. K úbytku aktivity dochází i při substituci chloru nebo amino skupiny v této pozici (Veselý *et al.*, 1994). Naopak zcela nejúčinnější látky získáme rozvětvením necyklické hydroxyalkylamino skupiny ve zmiňované poloze dalším alkylem vicinálním na aminoskupině (Brooks *et al.*, 1997).

Velmi účinné jsou deriváty purinu substituované v pozici C6 anilinem či benzylaminem. Pokud do ortho polohy navážeme anilin, dojde k poklesu aktivity. Naopak zvýšení aktivity docílíme u chlor- a bromderivátů v poloze meta. O něco menší zvýšení aktivity lze pozorovat u stejných derivátů substituovaných v para poloze. Nejaktivnější látkou substituovanou v místě C6 purinové kostry 3-chlor-4-karboxyanilino skupinou je Purvalanol B, jehož součástí je solný můstek spojující karboxylovou skupinu s Lys⁸⁹ v ATP vazebném místě (Gray *et al.*, 1998). Se zvýšenou účinností Purvanolu B souvisí také pokles protinádorové aktivity, což je pravděpodobně způsobeno nízkou propustností buněčné membrány. U C6-aminobenzylových derivátů, na rozdíl od C6-anilino derivátů, nemá přídavek dalšího substituentu na aromatické jádro zásadní vliv na CDK inhibiční aktivitu. Některé substituce methoxy skupiny (v para poloze) nebo jodu (v meta poloze) mohou souviset se zvýšením aktivity (Fisher & Lane, 2000).

Co se týče inhibice CDK je obměna substituentů v poloze 9 na purinovém skeletu limitována. Přijatelné jsou menší alicyklické, alifatické či hydroxylové skupiny (Schow *et al.*, 1997). Vhodným zbytkem navázaným v pozici N9 se jeví isopropyl (Havlíček *et al.*, 1997), který vykazuje zvýšenou CDK2 inhibiční aktivitu vzhledem k ethylové, cyklopentylové či methylové skupině (Legraverend *et al.*, 1999). Zavedení stéricky objemnějších skupin do tohoto místa je nevhodné, protože výrazně snižují inhibiční aktivitu (Legraverend *et al.*, 1999).

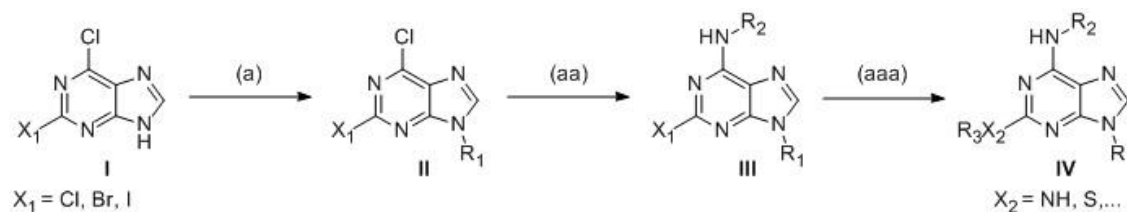
3.3.2 Syntetické přístupy k 2,6,9-trisubstituovaným purinovým derivátům

V současné době se pro přípravu C2,C6,N9-trisubstituovaných purinových sloučenin používá několik metod. Mezi nejběžnější patří klasická organická syntéza, organická syntéza na pevné fázi a syntéza probíhající za asistence mikrovln.

Klasická organická syntéza purinových látek v roztoku je pouze 3-stupňová. Obvykle bývá zahájena komerčně dostupným 2,6-dichlorpurinem (neboli 2,6-DCP), případně může být místo atomu chloru v poloze C2 reaktivnější atom fluoru nebo jodu (Havlíček, 2004). Existuje celá řada možností jak pomocí této syntézy připravit dané puriny.

Schéma 1: Příklad klasické organické syntézy derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů:

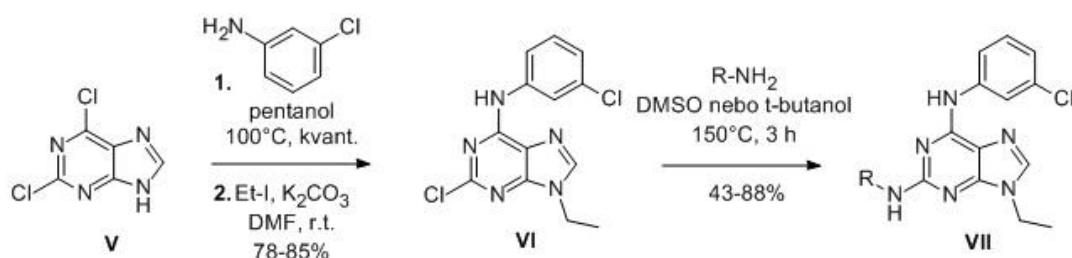
(a) 1. R_1Br (I), K_2CO_3 , DMSO nebo 2. Mitsunobu alkylace R_1OH , DEAD, PPh_3 ; (aa) R_2NH_2 , 40-115°C; (aaa) 1. R_3X_2H ($X_2 = NH$ či S), /N-methylpyrrolid-2-on/, nebo 2. $ArNH_2$, Buchwald- Hartwing Pd-katalyzovaná reakce, nebo 3. alkynylace podle Hecka $Pd(PPh_3)Cl_2$ (Havlíček, 2004).



V prvním kroku reakce (Imbach *et al.*, 1999) se tvoří nevýhodný N7-alkylderivát, což je způsobeno převážně při methyloaci, při zavádění objemnějších skupin (isopropyl) k N7 tato reakce nehraje roli. Průběh reakce je zkomplikován vznikem špatně rozpustných sloučenin, které se tvoří kondenzací purinu (Havlíček, Strnad – nepublikované výsledky) (spojení C6-N9 a C6-N7). Tato syntetická cesta je vhodná tehdy, pokud je R_1 zbytek citlivý k alkylaci (př. obsahuje fenolytický hydroxyl). Výhodněji je možné alkylaci provést Mitsunobu reakcí (Toyota *et al.*, 1993) u substituentů, u kterých může dojít k přesmyku karbokationtu při alkylaci alkylhalogenidem. Mitsunobu alkylace je sice dražší než halogenidová reakce, která využívá levnějších prekurzorů, avšak vykazuje mnohem vyšší selektivitu. Abychom se vyhnuli regioselektivní komplikaci v poloze N7, je nutné provést reakci za mírných Mitsunobu podmínek a laboratorní teploty (Demange *et al.*, 2013). Například při přípravě 9-cyklopentyl-2,6-dichloro-9H-purinu za Mitsunobu podmínek je alkylace přes

90% selektivní k izomeru N9. Tvoří se i malé množství izomeru N7, které však lze odstranit krystalizací z ethanolu (Gucký *et al.*, 2013). Jako poměrně obtížně substituovatelný se jeví atom chloru v C2 pozici (3. reakční krok). Vyžaduje nejen vysoké teploty, ale také dlouhý reakční čas. Reakce je navíc doprovázena přítomností velkého přebytku aminu nebo vhodného rozpouštědla, kterým se osvědčil N-methylpyrolid-2-on. Jde o nereaktivní, ale účinnou bázi se silnými rozpouštěcími vlastnostmi. Rozvětvenější aminy však reagují méně ochotně a syntéza s citlivými C6-NHR₂ je neúspěšná. Tato potíž je vyřešena použitím reaktivnějších C2-F či C2-I derivátů, kdy aminace C6-Cl pro svůj průběh potřebuje pouze 40 °C a aminace C2-I 120 °C teplotu (Havlíček, 2004).

Schéma 2. Jiný příklad klasické organické syntézy derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Imbach *et al.*, 1999).



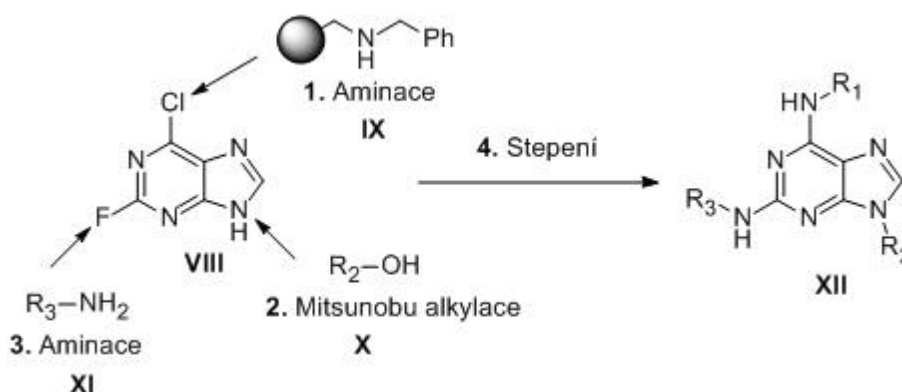
V prvním kroku reaguje zmíněný 2,6-DCP **V** s 3-chloranilinem v prostředí alkoholu pentanolu 3 hodiny při teplotě 100°C. Před alkylací je nutné provést náhradu pozice C6 chlorem proto, aby se zabránilo alkylaci v pozici N7, která je nevýhodná a proběhla tak jen v poloze N9. Vzniklý meziprodukt **VI** (Kjellberg & Johansson, 1989) posléze reaguje s vhodným aminem ve vysokovroucím rozpouštědle DMSO či t-butanolu. Nakonec získám 2,6,9-trisubstituovaný purin, tedy látku **VII**, jejíž výtěžek se pohybuje okolo 43 - 88% (Imbach *et al.*, 1999).

Mimo klasickou syntézu lze deriváty 2,6,9-trisubstituovaných purinů získat i pomocí tzv. syntézy na pevné fázi. Tento syntetický přístup umožňuje snadné a rychlé provedení většího množství reakcí (paralelní syntéza) a kromě jiných výhod dokáže jednoduše a univerzálně izolovat intermediáty z reakční směsi (http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/?page_id=8522). Ideálním nosičem pro organickou syntézu na pevné fázi je polymerní pryskyřice. Na ní ulpívají (se zachytávají) některé reaktanty, které je možné po uplynutí reakce oddělit. Právě spojnice mezi tímto polymerním nosičem a imobilizovanou komponentou, tzv. linker

umí šetrně a za přesně definovaných podmínek odštěpit (mezi)produkt z polymeru (Soural *et al.*, 2010).

Jako příklad je uvedena příprava látky **XI**, kde je nejprve nutná aktivace aminopryskyřice kyselinou 5-(4-formyl-3,5-dimethoxyfenyloxy) valerovou. Upravená pryskyřice následně podlehně reduktivní aminaci za vzniku modifikované pevné fáze **IX**. Aby byl zajištěn hladký průběh reakce je třeba provést v poloze N9 derivatizaci trimethylsilylethoxymethylem, následkem čehož pak sloučeniny **IX** a **X** kondenzují za mírných podmínek. Po deprotekcí dusíku N9 tetrabutylamonium fluoridem dojde v této pozici k alkylaci vhodným ligandem a zároveň k záměně halogenu v místě C2 za žádaný substituent. Konečného odštěpení či uvolnění látky **XII** dosáhneme reakcí s kyselinou trifluoroctovou (Havlíček, 2004).

Schéma 3: Obecný postup organické syntézy 2,6,9-trisubstituovaných purinů na pevné fázi (Havlíček, 2004; Chang *et al.*, 1999).

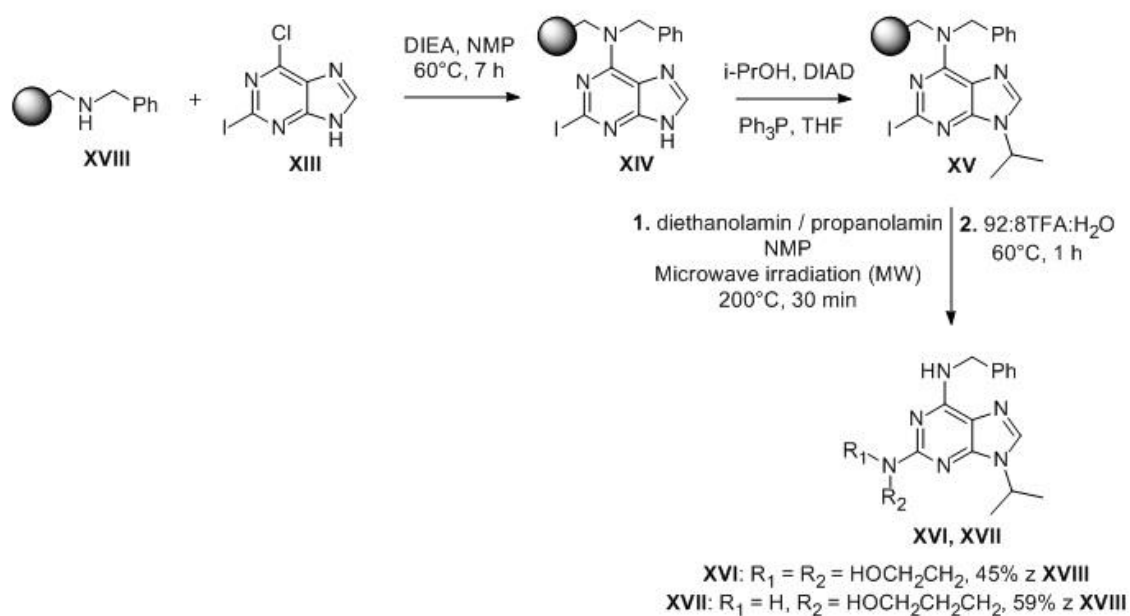


Velmi pozitivní metodou se v posledních letech jeví mikrovlnně asistovaná organická syntéza (MAOS). Ve srovnání s tradičními možnostmi ohřevu se vyznačuje velmi rychlým průběhem reakcí, vysokou čistotou a výtěžností produktů, schopností snížit počet nežádoucích vedlejších reakcí atd (Krstenansky & Cotterill, 2000). Lze ji kombinovat jak s klasickou organickou syntézou v roztoku, tak i s organickou syntézou na pevné fázi. Jako příklad je uvedena organická syntéza na pevné fázi za asistence mikrovln.

Sled reakcí je započat navázáním vhodného aminu na pryskyřici. Takto vzniklá (již výše uvedená) modifikovaná pevná fáze **XVIII** (Austin *et al.*, 2002a) dále reaguje s **XIII** při teplotě $60^\circ C$ v prostředí NMP a DIEA zhruba 7 hodin. Po uplynutí reakce

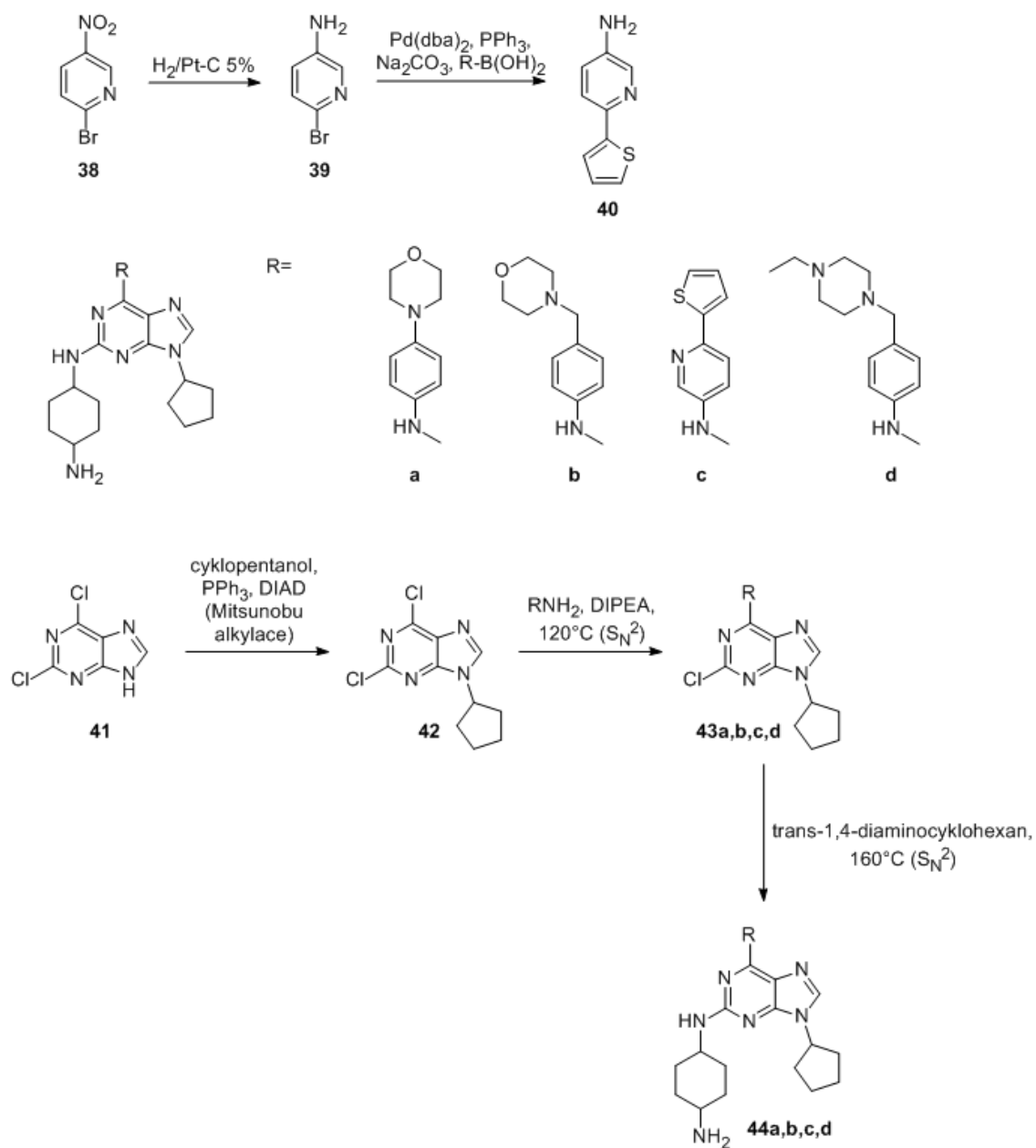
dostaneme **XIV**, která následně podle Mitsunobu alkylation s isopropylalkoholem v přítomnosti diisopropyl azodikarboxylátu a trifenylyfosfinu v THF za tvorby **XV**. Další krok pak probíhá v mikrovlnném reaktoru při 200°C cca 30 minut, kdy dochází u pryskyřice **XV** k záměně jodu v pozici C2 dvěma typy alifatických aminů (diethanolaminem či propanolaminem). Podobně jako tomu bylo u předchozí metody je výsledný produkt **XVI** (Verdugo *et al.*, 2001) či **XVII** (Otyepka *et al.*, 2000) z pryskyřice odštěpen pomocí kyseliny trifluoroctové ve směsi s vodou zahřáté na 60°C (Austin *et al.*, 2002b).

Schéma 4: Příklad organické syntézy na pevné fázi 2,6,9-trisubstituovaných purinů za asistence mikrovln (Austin *et al.*, 2002b).



4 Dosažené výsledky

Schéma 5: Syntéza prekurzorů a cílových inhibitorů.



4.1 Syntéza prekurzorů

Příprava 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu **42** vychází z komerčně dostupného 2,6-dichlor-9H-purinu **41**, který byl substituován v poloze N9 cyklopentanolem za mírných podmínek tzv. Mitsunobu alkylace (Shum *et al.*, 2001). Mitsunobu alkylace vykazovala vyšší regioselektivitu než halogenidová metoda. Při syntéze této látky za mírných Mitsunobu podmínek byla alkylace přes 90% selektivní k izomeru N9. Vzniklo jen malé množství izomeru N7, které bylo odstraněno krystalizací z ethanolu (Gucký *et al.*, 2013).

Redukce nitroskupiny pro přípravu 6-brompyridin-3-aminu **39** z 2-brom-5-nitropyridinu **38** byla nejprve provedena za přítomnosti katalyzátoru Pd/C. Kvůli tvorbě vedlejšího produktu dehydrohalogenace, 3-aminopyridinu, bylo nutné reakci zopakovat, tentokrát však za použití jiného, a to Pt/C katalyzátoru, díky němuž byla získána látka 6-brompyridinyl-3-amin **39** bez vedlejších produktů. Nebylo ani nutné použít katalyzátor Pt-S/C, jak je uvedeno v (Kasparian *et al.*, 2011).

Látka 6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-amin **40** byla připravena z 6-brompyridin-3-aminu **39** za podmínek Suzukiho couplingu s použitím katalyzátoru Pd(dba)₂ a trifenylofosfinu. Trifenylofosfin a trifenylofosfinoxid, které znečišťovaly produkt **40**, byly odstraněny extrakcí z kyselého prostředí.

4.2 S_N2 v poloze C6

Výchozí látkou pro přípravu 2-chlor-9-cyklopentyl-N-(4-morfolinofenyl)-9H-purin-6-aminu **43a**, 2-chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-9H-purin-6-aminu **43b**, 2-chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)fenyl)-9H-purin-6-aminu **43c** a 2-chlor-9-cyklopentyl-N-(6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)-9H-purin-6-aminu **43d** byl 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu **42**, jehož příprava je popsána výše. Reakce probíhaly za podmínek S_N2 v tlakové ampuli za bazické katalýzy N,N-diisopropyl-N-ethyleminem použitím rozpouštědla n-propanolu. Pro získání čistých látek bylo nutné provést extrakci ethylacetátem a surové produkty krystalovat z ethanolu.

4.3 S_N2 v poloze C2

Všechny 4 prekurzory připravené za podmínek S_N2 **43a** - **43d** byly následně podrobeny substituci nukleofilní 2 v pozici C2, kdy chlor ve všech případech nahrazen trans-1,4-

diaminocyklohexylamino skupinou za vzniku cílových inhibitorů **44a** - **44d**. Reakce probíhaly v tlakové ampuli, avšak bez použití rozpouštědla v tavenině. Příprava látek vyžadovala vyšší teplotu, ale za to kratší reakční dobu než příprava prekurzorů za podmínek S_N2 substituovaných v poloze C6. Pro získání čistých látek bylo nutné provést extrakci ethylacetátem a následně získané produkty ještě vyčistit na koloně.

4.4 Biologická aktivita připravených inhibitorů **44a** – **44d**

Připravené cílové inhibitory **44a** – **44d** byly předány k testování vybraných biologických aktivit Laboratoři růstových regulátorů PřF UP a ÚEB AV ČR. Zejména se jednalo o testování CDK inhibiční aktivity a testy cytotoxicity na vybraných buněčných leukemických liniích (K562 a U937). Na tomto testování jsem se osobně nepodílela, avšak pro úplnost shrnuji předběžná data v tabulce 5. Ve všech případech se jedná o data získaná ze tří měření, směrodatná odchylka nepřesahuje hodnotu 15 %.

Tabulka 5:

Kód látky	Cytotoxicita Linie K562 IC ₅₀ (μM)	Cytotoxicita Linie U937 IC ₅₀ (μM)	CDK 2 inhibiční aktivita IC ₅₀ (μM)	CDK 5 inhibiční aktivita IC ₅₀ (μM)	CDK 7 inhibiční aktivita IC ₅₀ (μM)
44a	1,19	2,13	0,017	-	-
44b	0,45	0,62	0,007	0,034	0,178
44c	0,57	0,79	0,002	-	-
44d	1,05	0,61	0,028	-	-

Na základě získaných výsledků biologických experimentů lze konstatovat, že všechny připravené cílové inhibitory **44a** – **44d** vykazují silnou cytotoxicitu a zároveň významnou CDK inhibiční aktivitu.

5 Experimentální část

Materiál a metody

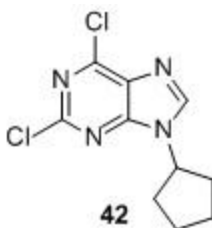
Silikagel (Grace), TLC desky (Merck), rozpouštědla DMSO- d_6 a $CDCl_3$ (Sigma Aldrich), ostatní rozpouštědla (Lach-Ner), 2,6-dichlorpurin (OLChemim), ostatní chemikálie (Sigma Aldrich).

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena na NMR spektrometru Bruker Avance AV 300 při frekvenci 300 MHz (1H) a 75 MHz (^{13}C) nebo na Jeol ECA 500 spektrometru při frekvenci 500 MHz (1H) a 125 MHz (^{13}C). Připravené látky byly rozpuštěny v deuterovaném chloroformu $CDCl_3$, či v DMSO- d_6 a hodnoty chemických posunů byly zaznamenány v jednotkách ppm. Čistota meziproductů a produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA). Vizualizace TLC byla sledována pod UV lampou (Camag) při vlnové délce λ 254 nm nebo 366 nm. Analýza připravených látek byla provedena na plynovém chromatografu GC Trace Ultra (Thermo Scientific). Byla použita kapilární kolona DB 5-MS (Agilent Technologies) [20 m, 0,18 mm, 25 μm], nosný plyn He, typ injektoru: splitless (teplota injektoru 250°C), bezděličové dávkování (1 μl) s teplotním programem: (60°C drženo 1 min; 20°C/min ramp do 260°C; 25°C/min ramp do 280°C, 280°C drženo 5 min). Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Polaris (Thermo Scientific) s využitím elektronové ionizace EI (elektron impact), s ionizační energií 70 eV. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve full scan módu v rozmezí 50-500 m/z. HPLC analýza produktů byla provedena chromatografií na reverzní (C18) fázi [150 mm x 4,6 mm, 5 μm] (Microsorb C18, Varian). Vzorke byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanoseny na kolonu a oddělené složky byly vymyty lineárním methanolickým gradientem při průtoku 0,6 ml/min. Detekce byla provedena skenováním UV absorbance eluátu mezi 240 a 300 nm. Hmotnostní spektra byla změřena na hmotnostním spektrometru (Waters ZMD 2000) s využitím pozitivní ionizace elektrosprejem. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve full scan módu v rozmezí m/z 50-800 Da. Hodnoty teplot tání zhotovených nových látek byly měřeny na bodotávku (B-540 Büchi Melting Point Apparatus, 120 V-Büchi).

5.2 Syntéza prekurzorů

5.2.1 2,6-Dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (Mitsunobu alkylace) (Shum *et al.*, 2001)

Směs 2,6-dichlor-9H-purinu (30.0 mmol), cyklopentanolu (60.0 mmol) a trifenylofosfinu (36.0 mmol) byla rozpuštěna v suchém tetrahydrofuranu (120 ml) a ochlazena v ledové lázni na teplotu 0°C. K tomuto roztoku byl za stálého míchání a chlazení vodou přidáván po kapkách roztok diisopropyl azodikarboxylátu (36.0 mmol) v THF (30 ml) takovou rychlostí, aby teplota nepřesáhla 20°C. Reakční směs byla poté míchána za laboratorní teploty pod argonem po dobu 2 hodin. Poté byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a odparek byl rozpuštěn ve vroucím toluenu (100 ml). Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok inokulován krystalem trifenylofosfinoxidu a roztok byl ponechán krystalizaci po dobu 24 hodin při teplotě 5°C. Vyloučený trifenylofosfinoxid byl zfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl konečně krystalován z ethanolu, přičemž byl získán 2,6-dichlor-9cyklopentyl-9H-purin.



Výtěžek: 56%, t.t.: 118-120°C.

Sumární vzorec: C₁₀H₁₀Cl₂N₄ (257.12)

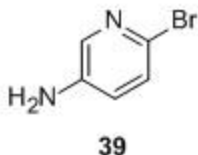
Elementární analýza: Vypočteno: C, 46.71; H, 3.92; N, 21.79. Nalezeno: C, 46.95; H, 3.81; N, 21.70.

HPLC-MS (ESI+): 258.10; HPLC-UV (99.6%).

¹H NMR (DMSO-d₆): 1.64-1.69 (m, 2H), 1.81-1.96 (m, 4H), 2.09-2.15 (m, 2H), 4.92 (qui, J=7.53, 1H, CH), 8.82 (s, 1H, CH).

5.2.2 6-Brompyridin-3-amin (Kasparian *et al.*, 2011)

2-Brom-5-nitropyridin (2,50 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (10 ml). Katalyzátor (5 % platina na aktivním uhlí; 12,3 μ mol; 0,5 mol%) byl suspendován v atmosféře dusíku v tetrahydrofuranu (10 ml) v 50 ml dvouhrdlé kulaté baňce. Poté byla připojena plynová byreta s vodíkem za normálního tlaku, proveden proplach aparatury 500 ml vodíku a po dobu 30 min ponechán katalyzátor k sycení. Poté byl přikapávací nálevkou přidán připravený roztok 2-brom-5-nitropyridinu a za intenzivního míchání byla provedena hydrogenace s kontrolou spotřeby vodíku (teor. spotřeba 163 ml). Po ukončení reakce byl zfiltrován katalyzátor přes křemelinu a filtrát odpařen za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl dále použit do reakce bez dalšího čištění.



Výtěžek: 98%, t.t.: 76-77°C.

Sumární vzorec: C₅H₅BrN₂ (173,01)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 34,71; H, 2,91; N, 16,19. Nalezeno: C, 34,42; H, 3,12; N, 15,28.

HPLC-MS (ESI+): 174,25; HPLC-UV 95,5%.

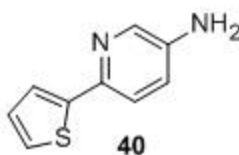
¹H NMR (DMSO-d₆): 3,52 (s(br), 2H, NH₂), 7,88 (d, J=8,02, 1H, ArH), 8,46 (s, 1H, ArH), 9,20 (d, J=8,02, 1H, ArH).

GC-MS: viz Příloha 1

5.2.3 6-(Thiofen-2-yl)pyridin-3-amin (Suzuki coupling) (WO 2012014994 A1)

Směs 2-brom-5-nitropyridinu (1,0 mmol) rozpuštěného ve 175 ml ethanolického roztoku, 2-thienylborité kyseliny (1,86 mmol), trifenylofosfinu (0,50 mmol) v 15 ml DME a 7,5 ml vody byla po přidavku katalyzátoru Pd(dba)₂ pod argonem a za stálého míchání zahřívána v tlakové ampuli při teplotě 120 °C po dobu 2 hodin. Po 90 minutách

byla provedena kontrola pomocí GC-MS. Po skončení reakce byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, zředěna 25 ml vody a podrobena extrakci 3x25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na rotační vakuové odparce. Odparek byl poté rozdělen mezi 10 ml DcM a 10 ml H₂O + 2 ml 1 M HCl. Organická fáze byla ještě jednou protřepána se směsí 10 ml H₂O + 2 ml 1 M HCl. Vodná fáze byla zalkalizována na pH=8,0 40 % K₂CO₃ a extrahována 2x10 ml DcM. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.



Výtěžek: 32%, t.t.: 56-57°C.

Sumární vzorec: C₉H₈N₂S (176,24)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 61,34; H, 4,58; N, 15,90. Nalezeno: C, 61,52; H, 4,33; N, 15,70.

HPLC-MS (ESI+): 177,28; HPLC-UV (98%).

¹H NMR (DMSO-d₆ nebo CDCl₃): 3,38 (s(br), 2H, NH₂), 7,25 (t, J=5,23, 1H, ArH), 7,42-7,55 (m, 2H, ArH), 7,65 (d, J=7,80, 1H, ArH), 8,22 (s, 1H, ArH), 8,88 (d, J=7,75, 1H, ArH).

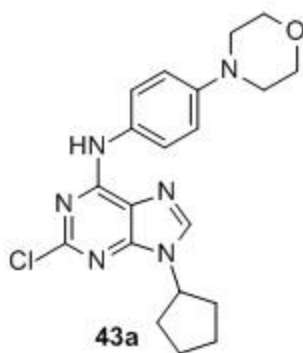
GC-MS: viz Příloha 2.

5.2.4 Obecný postup přípravy látek 43a – 43d.

Směs 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu (5,00 mmol), příslušného aromatického aminu (5,05 mmol) a N-ethyl-N,N-diisopropylaminu (15,0 mmol) v n-propanolu (10,0 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 20 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu s použitím mobilní fáze chloroform – methanol 19:1 byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (20 ml) a ethylacetát (20 ml).

Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 15 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl krystalován z ethanolu.

5.2.4.1 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-morfolinofenyl)-9H-purin-6-amin (43a)



Výtěžek: 35%, t.t.: 203-204°C.

Sumární vzorec: C₂₀H₂₃N₆OCl (398,89)

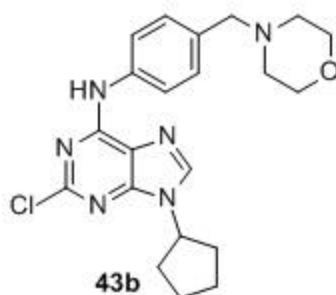
Elementární analýza: Vypočteno: C, 60,22; H, 5,81; N, 21,07. Nalezeno: C, 60,53; H, 6,21; N, 20,67.

HPLC-MS (ESI+): 398,6; HPLC-UV (97,97%).

¹H NMR (CDCl₃): 1,82-1,85 (m, 2H); 1,88-1,95 (m, 4H); 2,27-2,36 (m, 2H); 3,14-3,17 (m, 4H, 2xCH₂); 3,87-3,91 (m, 4H, 2xCH₂); 4,93 (qui, J=7,32, 1H, CH); 6,97 (d, J=8,94, 2H, ArH); 7,65 (d, J=8,94, 2H, ArH); 7,80 (s(br), 1H, NH); 7,83 (s, 1H, CH).

¹³C NMR (CDCl₃): 23,91; 33,04; 49,89; 55,97; 66,96; 116,54; 119,28; 121,89; 130,84; 138,78; 148,11; 150,70; 152,48; 154,03.

**5.2.4.2 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-9H-purin-6-amin
(43b)**



Výtěžek: 79%, t.t.: 239-242°C.

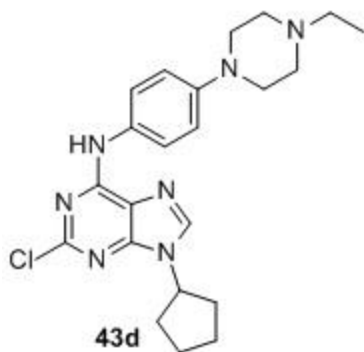
Sumární vzorec: C₂₁H₂₅N₆OCl (412,92)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 61,08; H, 6,10; N, 20,35. Nalezeno: C, 60,78; H, 5,94; N, 20,02.

HPLC-MS (ESI+): 413,82; HPLC-UV (96,5%).

¹H NMR (CDCl₃): 1,81-1,84 (m, 2H); 1,84-1,96 (m, 4H); 2,28-2,36 (m, 2H); 2,40-2,52 (m, 4H, 2xCH₂); 4,95 (qui, J=7,05, 1H, CH); 7,37 (d, J=8,22, 2H, ArH); 7,74 (d, J=8,22, 2H, ArH); 7,84 (s, 1H, NH); 7,87 (s, 1H, CH).

**5.2.4.3 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)fenyl)-9H-purin-6-amin
(43d)**



Výtěžek: 43%, t.t.: 210-212°C.

Sumární vzorec: C₂₂H₂₈N₇Cl (425,96)

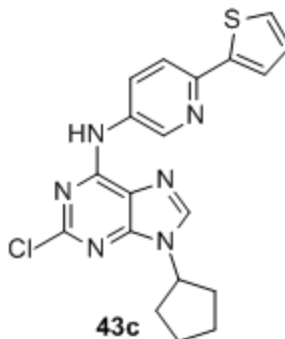
Elementární analýza: Vypočteno: C, 62,03; H, 6,63; N, 23,02. Nalezeno: C, 62,10; H, 6,41; N, 22,81.

HPLC-MS (ESI⁺): 425,7; HPLC-UV (98,54%).

¹H NMR (CDCl₃): 1,16 (t, J=7,2, 3H, CH₃); 1,77-1,81 (m, 2H); 1,90-1,95 (m, 4H); 2,26-2,32 (m, 2H); 2,48 (q, J=7,02, 2H, CH₂); 2,62-2,66 (m, 4H, 2xCH₂); 3,21-3,25 (m, 4H, 2xCH₂); 4,91 (qui, J=6,9, 1H, CH); 6,97 (d, J=9,00, 2H, ArH); 7,63 (d, J=9,00, 2H, ArH); 7,80-7,83 (m, 2H, CH, NH).

¹³C NMR (CDCl₃): 11,40; 17,90; 23,26; 32,42; 48,92; 51,82; 52,24; 55,28; 57,79; 116,15; 118,63; 121,18; 129,79; 138,06; 147,64; 150,01; 151,85; 153,40.

5.2.4.4 2-Chlor-9-cyklopentyl-N-(6-(thiopen-2-yl)pyridin-3-yl)-9H-purin-6-amin (43c)



Výtěžek: 56%, t.t.: 154-157°C.

Sumární vzorec: C₁₉H₁₇N₆SCl (396,90)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 57,50; H, 4,32; N, 21,17. Nalezeno: C, 57,82; H, 4,69; N, 21,03.

HPLC-MS (ESI⁺): 397,82; HPLC-UV (96,7%).

¹H NMR (DMSO-d₆): 1,59-1,65 (m, 2H); 1,73-1,94 (m, 4H); 2,05-2,22 (m, 2H); 4,85 (qui, J=6,95, 1H, CH); 7,14 (t, J=5,25, 1H, ArH); 7,59 (d, J=5,32, 1H, ArH); 7,74 (d,

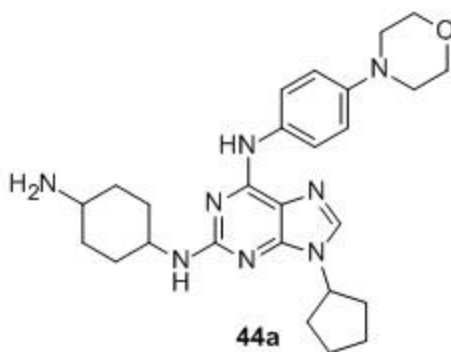
J=5,32, 1H, ArH); 7,80 (d, J=5,01, 1H, ArH); 7,85 (d, J=5,01, 1H, ArH); 8,41 (s, 1H, ArH); 8,27 (s, 1H, CH); 8,87 (s (br), 1H, NH).

5.3 Syntéza cílových inhibitorů

5.3.1 Obecný postup přípravy látek 44a - 44d.

Směs 2-chlor-6-subst.arylamino-9-cyklopentyl-9H-purinu (1,00 mmol) a trans-1,4-diaminocyklohexanu (20,0 mmol) byla zahřívána za stálého míchání při teplotě 160 °C v tlakové ampuli po dobu 240 minut. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu s použitím mobilní fáze chloroform – methanol 4:1 byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na teplotu přibližně 100 °C byla tako směs za stálého míchání zředěna vodou (15 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 15 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu s použitím mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc. vodný hydroxid amonný; 4 : 1 : 0,05 (vol.).

5.3.1.1 N^2 -(4-Aminocyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morfolinofenyl)-9H-purin-2,6-diamin (44a)



Výtěžek: 87%, t.t.: 112-118°C.

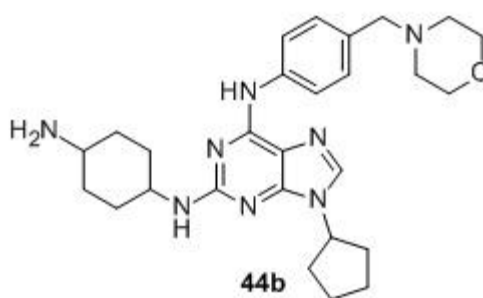
Sumární vzorec: C₂₆H₃₆N₈O (476,62)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 65,52; H, 7,61; N, 23,51. Nalezeno: C, 65,41; H, 7,39; N, 23,12.

HPLC-MS (ESI+): 477,59; HPLC-UV (96,4%).

¹H NMR (DMSO-d₆): 1,08-1,32 (m, 4H), 1,65 (s(br), 2H, NH₂), 1,68-2,07 (m, 12H), 2,54 (sep, J=3,93, 1H, CH), 3,14-3,18 (m, 4H), 3,87-3,91 (m, 4H), 3,60 (sex, J=3,66, 1H, CH), 4,69 (qui, J=7,11, 1H, CH), 6,50 (d, J=7,41, 1H, NH), 7,41 (d, J=8,85, 1H, ArH), 7,90 (s, 1H, CH), 8,04 (d, J=8,85, 1H, ArH), 9,58 (s(br), 1H, NH).

5.3.1.2 N²-(4-Aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-N⁶-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-9H-purin-2,6-diamin (44b)



Výtěžek: 35%, t.t.: 223-225°C.

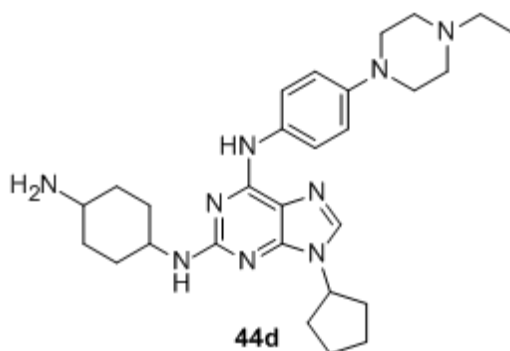
Sumární vzorec: C₂₇H₃₈N₈O (490,64)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 66,09; H, 7,81; N, 22,84. Nalezeno: C, 66,12; H, 7,55; N, 22,47.

HPLC-MS (ESI+): 490,8; HPLC-UV (94,5%).

¹H NMR (CDCl₃): 1,16-1,40 (m, 4H); 1,70-2,25 (m, 12H); 2,62-2,65 (m, 4H, 2xCH₂); 2,73 (s (br), 2H, NH₂); 2,76 (sep, J=5,34, 1H, CH); 3,48 (s, 2H, CH₂); 3,71-3,74 (m, 4H, 2xCH₂); 3,81 (s, J=5,45, 1H, CH); 4,72 (qui, J=6,93, 1H, CH); 4,77 (d, J=6,56, 1H, NH); 7,31 (d, J=8,31, 1H, ArH); 7,52-7,56 (m, 2H, CH, NH); 7,76 (d, J=8,31, 1H, ArH).

5.3.1.3 N²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-N⁶-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)fenyl)-9H-purin-2,6-diamin (44d)



Výtěžek: 77%, t.t.: 114-116°C.

Sumární vzorec: C₂₈H₄₁N₉ (503,69)

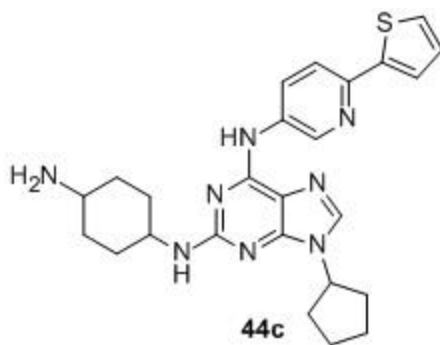
Elementární analýza: Vypočteno: C, 66,77; H, 8,20; N, 25,03. Nalezeno: C, 66,71; H, 8,02; N, 24,76.

HPLC-MS (ESI⁺): 504,75; HPLC-UV (97,25%).

¹H NMR (CDCl₃): 1,16 (t, J=7,20, 3H, CH₃); 1,23-1,44 (m, 4H); 1,76-2,32 (m, 14H); 2,48 (q, J=7,20, 2H, CH₂); 2,60-2,66 (m, 4H, 2xCH₂); 2,85 (m, 1H, CH); 3,20-3,22 (m, 4H, 2xCH₂); 3,80 (m, 1H, CH); 4,70 (d, J=5,25, 1H, NH); 4,76 (qui, J=6,83, 1H, CH); 6,95 (d, J=8,76, 1H, ArH); 7,40 (s (br), 1H, NH); 7,45 (s, 1H, CH); 7,66 (d, J=8,76, 1H, ArH).

5.3.1.4 N²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-N⁶-(6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)

9H-purin-2,6-diamin (44c)



Výtěžek: 72 %, t.t.: 123-127 °C.

Sumární vzorec: C₂₅H₃₀N₈S (474,62)

Elementární analýza: Vypočteno: C, 63,26; H, 6,37; N, 23,61. Nalezeno: C, 63,55; H, 6,78; N, 23,12.

HPLC-MS (ESI+): 475,78; HPLC-UV (98,2%).

^1H NMR (DMSO- d_6): 1,23-1,44 (m, 4H); 1,59-1,65 (m, 2H); 1,76-2,32 (m, 14H); 1,73-1,94 (m, 4H); 2,02-2,24 (m, 2H); 4,87 (qui, $J=6,95$, 1H, CH); 7,19 (t, $J=5,35$, 1H, ArH); 7,68 (d, $J=5,33$, 1H, ArH); 7,85 (d, $J=5,32$, 1H, ArH); 7,80 (d, $J=5,01$, 1H, ArH); 7,85 (d, $J=5,01$, 1H, ArH); 8,49 (s, 1H, ArH); 8,32 (s, 1H, CH); 8,80 (s (br), 1H, NH).

6 Závěr

Během řešení bakalářské práce byly splněny navržené cíle. Byl optimalizován syntetický přístup k prekursorům heterobiarylaminům, dále byly třístupňovým procesem syntézy v dobrých výtěžcích a odpovídající čistotě připraveny celkem 4 nové inhibitory CDK z řady 2,6,9-trisubstituovaných purinů, a to **44a** - **44d**. Z výsledků biologických experimentů je patrné, že všechny látky vykazují silnou cytotoxicitu a významnou CDK inhibiční aktivitu.

7 Literatura

- Abate A.A., Pentimalli F., Esposito L., Giordano A. (2013): ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **22**, 895-906.
- Akoulitchev S., Chuikov S., Reinberg D. (2000): TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-106.
- Alvi A., Gianella-Borradori A., Lane D., et al. (2003): A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in p53-independent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia by down-regulation of genes involved in transcription regulation and repair. *Blood* **102**, 1587 [abstract].
- Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C., Agid Y. (1997): Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and Histopathology* **12**, 25-31.
- Asghar U., Witkiewicz A.K., Turner N.C., Knudsen E.S. (2015): The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**, 130-146.
- Austin R.E., Waldruff C.A., Al-Obeidi F. (2002a): An alternative method for the preparation of resin-bound secondary amines. *Tetrahedron Letters* **43**, 3555-3556.
- Austin R.E., Okonya J.F., Bond D.R.S., Al-Obeidi F. (2002b): Microwave-assisted solid-phase synthesis (MASS) of 2,6,9-trisubstituted purines. *Tetrahedron Letters* **43**, 6169-6171.
- Barrie S.E., Eno-Amooquaye E., Hardcastle A., Platt G., Richards J. Bedford D., Workman P., Aherne W., Mitnacht S., Garretta M.D. (2003): High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of retinoblastoma protein phosphorylation in cells. *Analytical Biochemistry* **320**, 66-74.
- Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J.A., Galons H., Meijer L. (2008a): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**, 5797-5807.
- Bettayeb K., Sallam H., Ferandin Y., Popowycz F., Fournet G., Hassan M., Echalié A., Bernard P., Endicott J., Joseph B., Meijer L. (2008b): N-&N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Molecular Cancer Therapeutics* **7**, 2713-2724.
- Bettayeb K., Baunbaek D., Delehouze C., Loaëc N., Hole A.J., Baumli S., Endicott J.A., Douc-Rasy S., Bénard J., Oumata N., Galons H., Meijer L. (2010): CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes Cancer* **1**, 369-380.

- Blum W., Phelps M.A., Klisovic R.B., Rozewski D.M., Albanese K.A., Rovin B., Kefauver C., Devine S.M., Lucas D.M., Johnson A., Schaaf L.J., Byrd J.C., Marcucci G., Grever M.R. (2010): Phase I clinical and pharmacokinetic study of a novel schedule of flavopiridol in relapsed or refractory acute leukemias. *Haematologica* **95**, 1098-1105.
- Braun-Dullaeus R.C., Mann M.J., Dzau V.J. (1998): Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* **98**, 82-89.
- Bresnahan W.A., Boldogh I., Chi P., Tompson E.A., Albrecht T. (1997): Inhibition of cellular cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* **231**, 239-247.
- Brooks E.E., Gray N.S., Joly A., Kerwar S.S., Lum R., Mackman R.L., Norman T.C., Rosete J., Rowe M., Schow S.R., Schultz P.G., Wang X., Wick M.M., Shiffman D. (1997): CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 29207-29211.
- Bukanov N.O., Smith L.A., Klinger K.W., Ledbetter S.R., Ibraghimov-Beskrovnaya O. (2006): Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* **444**, 949-952.
- Cicenas J., Valius M. (2011): The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of cancer research and oncology* **137**, 1409-1418.
- Cicenas J., Kalyan K., Sorokinas A., Jatulyte A., Valiunas D., Kaupinis A., Valius M. (2014): Highlights of the Latest Advances in Research on CDK Inhibitors. *Cancers* **6**, 2224-2242.
- Cirstea D., Hideshima T., Santo L., Eda H., Mishima Y., Nemani N., Hu Y., Mimura N., Cottini F., Gorgun G., Ohguchi H., Suzuki R., Loferer H., Munshi N.C., Anderson K.C., Raje N. (2013): Small-molecule multi-targeted kinase inhibitor RGB-286638 triggers P53-dependent and -independent anti-multiple myeloma activity through inhibition of transcriptional CDKs. *Leukemia* **27**, 2366-2375.
- Cooperative group of clinical therapy of indirubin (1980): Clinical studies of 314 cases of CML treated with indirubin. *Chinese Journal of Hematology* **1**, 132-135.
- Cruz J.C., Tsai L.H. (2004a): A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 390-394.
- Cruz J.C., Tsai L.H. (2004b): Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 452-458.
- Cruz J.C., Kim D., Moy L.Y., Dobbin M.M., Sun X., Bronson R.T., Tsai L.-H. (2006): p25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid β *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience* **26**, 10536-10541.
- Dai Y., Grant S. (2003): Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology* **3**, 362-370.
- Davies T.G., Pratt D.J., Endicott J.A., Johnson L.N., Noble M.E. (2002): Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **93**, 125-133.

- De Azevedo W.F., Mueller-Dieckmann H.J., Schulze-Gahmen U., Worland P.J., Sausville E., Kim S.H. (1996): Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 2735-2740.
- De Azevedo W.F., Leclerc S., Meijer L., Strnad M., Kim S.-H. (1997): Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues: Crystal Structure of Human Cdk2 Complexed With Roscovitine. *European Journal of Biochemistry* **243**, 518-526.
- De Lartigue J. (2014): CDK Becomes Hot Target Again: Cell Cycle Inhibitors Compete for Success in Breast Cancer and CLL. *Oncology Live* , 1-3
www.onclive.com/publications/oncology-live/2014/cdk-becomes-hot-target-again-cell-cycle-inhibitors-compete-for-success-in-breast-cancer-and-cll/1.
- Dei A., Wong E.T., Cheok C.F., Tergaonkar V., Lane D.P. (2008): R-Roscovitine simultaneously targets both the p53 and NF-kappaB pathways and causes potentiation of apoptosis: implications in cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* **15**, 263-273.
- Demange L., Lozach O., Ferandin Y., Hoang N.T., Meijer L., Galons H. (2013): Synthesis and evaluation of new potent inhibitors of CK1 and CDK5, two kinases involved in Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research* **22**, 3247-3258.
- Diaz-Padilla I., Siu L.L., Duran I. (2009): Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Investigational New Drugs* **27**, 586-594.
- Dreyer M.K., Borcharding D.R., Dumont J.A., Peet N.P., Tsay J.T., Wright P.S., Bitonti A.J., Shen J., Kim S.-H. (2001): Crystal structure of human cyclin-dependent kinase 2 in complex with the adenine-derived inhibitor H717. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 524-530.
- Doerig C. (2002): New approaches to the assessment of protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Trends in Parasitology* **18**, 366-371.
- Espinoza F.H., Farrell A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Morgan D.O. (1996): A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science* **273**, 1714-1717.
- Feldmann G., Mishra A., Bisht S., Karikari C., Garrido-Laguna I., Rasheed Z., Ottenhof N.A., Dadon T., Alvarez H., Fendrich V., Rajeshkumar N.V., Matsui W., Brossart P., Hidalgo M., Bannerji R., Maitra A., Nelkin B.D. (2011): Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biology & Therapy* **12**, 598-609.
- Fischer P.M., Lane D.P. (2000): Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Current Medicinal Chemistry* **7**, 1213-1245.
- Fischmann T.O., Hruza A., Duca J.S., Ramanathan L., Mayhood T., Windsor W.T., Le H.V., Guzi T.J., Dwyer M.P., Paruch K., Doll R.J., Lees E., Parry D., Seghezzi W., Madison V.

- (2008): Structure-guided discovery of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biopolymers* **89**, 372-379.
- Fisher R.P., Morgan D.O. (1994): A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**, 713-724.
- Fisher R.P. (2005): Secrets of a double agent: Cdk7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science* **118**, 5171-5180.
- Fry D.W., Harvey P.J., Keller P.R., Elliott W.L., Meade M., Trachet E., Albassam M., Zheng X., Leopold W.R., Pryer N.K., Toogood P.L. (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1427-1438.
- Galons H., Oumata N., Gloulou O., Meijer L. (2013): Cyclin-dependent kinase inhibitors closer to market launch? *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **23**, 945-963.
- Garrett M.D. (2001): Cell cycle control and cancer. *Current Science* **81**, 515-522.
- Garriga J., Graña X. (2004): Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* **337**, 15-23.
- Glicksman M.A., Cuny G.D., Liu M., Dobson B., Auerbach K., Stein R.L., Kosik K.S. (2007): New approaches to the discovery of cdk5 inhibitors. *Current Alzheimer Research* **4**, 547-549.
- Goh K.C., Novotny-Diermayr V., Hart S., Ong^a L.C., Loh Y.K., Cheong A., Tan Y.C., Hu C., Jayaraman R., William A.D., Sun E.T., Dymock B.W., Ong^b K.H., Ethirajulu K., Burrows F., Wood J.M. (2012): TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia* **26**, 236-243.
- Götz J., Ittner^a A., Ittner^b L.M. (2012): Tau-targeted treatment strategies in Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology* **165**, 1246-1259.
- Gravitz L. (2011): Drugs: a tangled web of targets. *Nature* **475**, S9-S11.
- Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M., Norman T.C., Kwon S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Lim S.-H., Lockhart D.J., Schultz P.G. (1998): Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**, 533-538.
- Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Bazinger V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V. (2013): A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**, 6234-6247.
- Hahntow I., Schneller F., Oelsner M., Weick K., Ringshause I., Fend F., Peschel C., Decker T. (2004): Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **18**, 747-755.
- Hardcastle I.R., Golding B.T., Griffin R.J. (2002): Designing Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 325-348.

- Hardcastle I.R., Arris C.E., Bentley J., Boyle F.T., Chen Y., Curtin N.J., Endicott J.A., Gibson A.E., Golding B.T., Griffin R.J., Jewsbury P., Menyerol J., Mesguiche V., Newell D.R., Noble M.E., Pratt D.J., Wang L.Z., Whitfield H.J. (2004): N2-substituted O6-cyclohexylmethylguanine derivatives: potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 3710-3722.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 408-412.
- Havlíček L., Fuksová K., Kryštof V., Orság M., Vojtěšek B., Strnad M. (2005): 8-Azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 5399-5407.
- Heath E.I., Bible K., Martell R.E., Adelman D.C., LoRusso P.M. (2008): A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. *Investigational New Drugs* **26**, 59-65.
- Honma T., Hayashi K., Aoyama T., Hashimoto N., Machida T., Fukasawa K., Iwama T., Ikeura C., Ikuta M., Suzuki-Takahashi I., Iwasawa Y., Hayama T., Nishimura S., Morishima H. (2001a): Structure-based generation of a new class of potent Cdk4 inhibitors: new *de novo* design strategy and library design. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 4615-4627.
- Honma T., Yoshizumi T., Hashimoto N., Hayashi K., Kawanishi N., Fukasawa K., Takaki T., Ikeura C., Ikuta M., Suzuki-Takahashi I., Hayama T., Nishimura S., Morishima H. (2001b): A novel approach for the development of selective Cdk4 inhibitors: library design based on locations of Cdk4 specific amino acid residues. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 4628-4640.
- Hossel R., Leclerc S., Endicott J.A., Nobel M.E.M., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberger E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L. (1999): Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* **1**, 60-67.
- Hsieh W.S., Soo R., Peh B.K., Loh T., Dong D., Soh D., Wong L.S., Green S., Chiao J., Cui C.Y., Lay Y.F., Lee S.C., Mow B., Soong R., Salto-Tellez M., Goh B.-C. (2009): Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer. *Clinical cancer* **15**, 1435-1442.
- Chang Y.T., Gray N.S., Rosania G.R., Sutherlin D.P., Kwon S., Norman T.C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P.G. (1999): Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chemistry & Biology* **6**, 361-375.

- Chen H.H., Wang Y.C., Fann M.J. (2006): Identification and Characterization of the CDK12/Cyclin L1 Complex Involved in Alternative Splicing Regulation. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 2736-2745.
- Chen R., Wierda W.G., Chubb S., Hawtin R.E., Fox J.A., Keating M.J., Gandhi V., Plunkett W. (2009): Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **113**, 4637-4645.
- Cheung Z.H., Ip N.Y. (2012): Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends in Cell Biology* **22**, 169-175.
- Imbach P., Capraro H.-G., Furet P., Mett H., Meyer T., Zimmermann J. (1999): 2,6,9-trisubstituted purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 91-96.
- Imahori K., Uchida E. (1997): Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *Journal of Biochemistry* **121**, 179-188.
- Israels^a E.D., Israels^b L.G. (2000): The Cell Cycle. *The Oncologist* **5**, 510-513.
- Ittner^b L.M., Götz J. (2011): Amyloid- β and Tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 65-72.
- Jiráček R. (2009): Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* **5**, 176-178.
- Jorda R., Havlíček L., McNae I.W., Walkinshaw M.D., Voller J., Šturm A., Navrátilová J., Kuzma M., Mistřík M., Bartek J., Strnad M., Kryštof V. (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 2980-2993.
- Jorda R., Paruch K., Kryštof V. (2012): Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres. *Current Pharmaceutical Design* **18**, 2974-2980.
- Joshi^a K.S., Rathos M.J., Joshi^b R.D., Sivakumar M., Mascarenhas M., Kamble S., Lal B., Sharma S. (2007a): *In vitro* antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**, 918-925.
- Joshi^a K.S., Rathos M.J., Mahajan P., Wagh V., Shenoy S., Bhatia D., Chile S., Sivakumar M., Maier A., Fiebig H.-H., Sharma S. (2007b): P276-00, a novel cyclin-dependent inhibitor induces G1-G2 arrest, shows antitumor activity on cisplatin-resistant cells and significant *in vivo* efficacy in tumor models. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**, 926-934.
- Kabadi S.V., Stoica B.A., Loane D.J., Luo T., Faden A.I. (2014): CR8, a novel inhibitor of CDK, limits microglial activation, astrogliosis, neuronal loss, and neurologic dysfunction after experimental traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **34**, 502-513.
- Kaldis P., Sutton A., Solomon M.J. (1996): The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* **86**, 553-564.

- Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavitian S.V., Stockert E., Day III R.S., Johnson B.E., Skolnick M.H. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor-types. *Science* **264**, 436-440.
- Kasparian A.J., Savarin C., Allgeier A.M., Walker S.D. (2011): Selective Catalytic Hydrogenation of Nitro Groups in the Presence of Activated Heteroaryl Halides. *The Journal of Organic Chemistry* **76**, 9841-9844.
- Kasten M., Giordano A. (2001): Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* **20**, 1832-1838.
- Kaur G., Stetler-Stevenson M., Sebers S., Worland P., Sedlacek H., Myers C., Czech J., Naik R., Sausville E. (1992): Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *Journal of the National Cancer Institute* **84**, 1736-1740.
- Kesavapany S., Li B.-S., Amin N., Zheng Y.-L., Grant P., Pant H.C. (2004): Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1697**, 143-153.
- Kim^a E.H., Kim^b S.U., Shin D.Y., Choi K.S. (2004): Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* **23**, 446-456.
- Kitagawa M., Okabe T., Ogino H., Matsumoto H., Suzuki-Takahashi I., Kokubo T., Higashi H., Saitoh S., Taya Y., Yasuda H., et al. (1993): Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **8**, 2425-2432.
- Kjellberg J., Johansson N.G. (1989): Studies on the Alkylation of Derivatives of Guanines. *Nucleosides and Nucleotides* **8**, 225-256.
- Knockaert M., Gray N., Damiens E., Chang Y.T., Grellier P., Grant K., Fergusson D., Mottram J., Soete M., Dubremetz J.F., Le Roch K., Doerig C., Schultz P., Meijer L. (2000): Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chemistry & Biology* **7**, 411-422.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**, 417-425.
- Krstenansky J. L., Cotterill L. (2000): Recent advances in microwave-assisted organic synthesis. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **3**, 454-461.
- Kryštof V., Strnad M. (2001): Inhibitory cyklin-dependentních kinas. *Chemické Listy* **95**, 295-300.
- Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002): Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**, 3283-3286.
- Kryštof V., McNae I.W., Walkinshaw M.D., Fischer P.M., Muller P., Vojtěšek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005): Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-

- trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 1763-1771.
- Kryštof V., Moravcová D., Paprskářová M., Barbier P., Peyrot V., Hlobilková A., Havlíček M., Strnad M. (2006): Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-d]pyrimidine analogues of myoseverin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 1405-1411.
- Kryštof V., Uldrijan S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets* **11**, 291-302.
- Lapenna S., Giordano A. (2009): Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 547-566.
- Larochelle S., Merrick K.A., Terret M.-E., Wohlbald L., Barboza N.M., Zhang C., Shokat K.M., Jallepalli P.V., Fisher R.P. (2007): Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/CyclinB and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells. *Molecular Cell* **25**, 839-850.
- Le T.C., Faivre S., Laurence V., Delbaldo C., Vera K., Girre V., Chiao J., Armour S., Frame S., Green S.R., Gianella-Borradori A., Dieras V., Raymond E. (2010): Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer* **46**, 3243-3250.
- Lee M.-S., Kwon Y.-T., Li M., Peng J., Friedlander R.M., Tsai L.-H. (2000): Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360-364.
- Legraverend M., Ludwig O., Bisagni E., Leclerc S., Meijer L., Giocanti N., Sadri R., Favaudon V. (1999): Synthesis and in vitro evaluation of novel 2,6,9-trisubstituted purines acting as cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 1281-1293.
- Levine A.J. (1997): p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323-331.
- Li B.S., Zhang L., Takahashi S., Ma W., Jaffe H., Kulkarni A.B., Pant H.C. (2002): Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *The EMBO Journal* **21**, 324-333.
- Lolli G., Johnson L.N. (2005): CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* **4**, 572-577.
- Lopes J.P., Oliveira C.R., Agostinho P. (2010): Neurodegeneration in an A β -induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell* **9**, 64-77.
- Loyer P., Trembley J.H., Katona R., Kidd V.J., Lahti J.M. (2005): Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cellular Signalling* **17**, 1033-1051.
- MacCallum D.E., Melville J., Watt K., Anderson S., Frame S., Gianella-Borradori A., Lane D.P., Green S.R. (2004): CYC202 (R-roscovitine) induces apoptosis in multiple myeloma cells by down regulation of Mcl-1. Proceeding American Association for Cancer Research **45**, 823[abstract].

- MacCallum D.E., Melville J., Frame S., Watt K., Anderson S., Gianella-Borradori A., Lane D.P., Green S.R. (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitrine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research* **65**, 5399-5407.
- Maestre C., Delgado-Esteban M., Gomez-Sanchez J.C., Bolaños J.P., Almedia A. (2008): Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in exocytotoxicity. *The EMBO Journal* **27**, 2736-2745.
- Mahadevan D., Plummer R., Squires M.S., Rensvold D., Kurtin S., Pretzinger C., Dragovich T., Adams J., Lock V., Smith D.M., Von Hoff D., Calvert H. (2011): A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor in patients with refractory solid tumors. *Annals of Oncology* **22**, 2137-2143.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630-641.
- Mariaule G., Belmont P. (2014): Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? A short survey. *Molecules* **19**, 14366-14382.
- Markus M.A., Kahle P.J., Winkler A., Horstmann S., Anneser J.M.H., Borasio G.D. (1997): Survival-promoting activity of inhibitors of cyclin-dependent kinases on primary neurons correlates with inhibition of c-Jun kinase-1. *Neurobiology of disease* **4**, 122-133.
- Meijer L. (1996): Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Cell Biology* **6**, 393-397.
- Meijer L., Raymond E. (2003): Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts of Chemical Research* **36**, 417-425.
- Menn B., Ivanov A., Bach S., Ben-Ari Y., Meijer L., Timsit S. (2008): Systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection in stroke model. *Annals of Neurology*, submitted for publication.
- Misra R.N., Xiao H., Kim K.S., Lu S., Han W.-C., Barbosa S.A., Hunt J.T., Rawlins D.B., Shan W., Ahmed S.Z., Qian L., Chen B.C., Zhao R., Bednarz M.S., Kellar K.A., Mulheron J.G., Batorsky R., Roongta U., Kamath A., Marathe P., Ranadive S.A., Sack J.S., Tokarski J.S., Pavletich N.P., Lee F.Y., Webster K.R., Kimball S.D. (2004): N-(cycloalkylamino)acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. N-[5-[[[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 1719-1728.
- Mita^a M.M., Joy A.A., Mita^b A., Sankhala K., Jou Y.M., Zhang D., Statkevich P., Zhu Y., Yao S.L., Small K., Bannerji R., Shapiro C.L. (2014): Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Clinical Breast Cancer* **14**, 169-176.
- Monaco E.A.III. (2004a): Recent evidence regarding a role for CDK5 dysregulation in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* **1**, 33-38.

- Monaco E.A., Beaman-Hall C.M., Mathur A., Vallano M.L. (2004b): Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochemical Pharmacology* **67**, 1947-1964.
- Morgan D.O. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Murthi K.K., Dubay M., McClure C., Brizuela L., Boisclair M.D., Worland P.J., Mansuri M.M., Pal K. (2000): Structure-activity relationship studies of flavopiridol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **10**, 1037-1041.
- Nelson P.J., Gelman I.H., Klotman P.E. (2001): Suppression of HIV-1 expression by inhibitors of cyclin-dependent kinases promotes differentiation of infected podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology* **12**, 2827-2831.
- Niesvizky R., Lentzsch S., Bardos A.Z., Chanan-Khan A.A., Singhal S.B., Zonder J.A., Vij R., Huang X., Diliberto M., Courtney R., Shaik M.N., Kim S.T., Randolph S., Ely S.A., Chen-Kiang S. (2010): A Phase 1 Study of PD 0332991: Complete CDK4/6 Inhibition and Tumor Response in Sequential Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. Oral sessions: myeloma-therapy, excluding transplantation: myeloma phase I/II trials and correlative studies. <https://ash.confex.com/ash/2010/webprogram/Paper26540.html>
- Nishio K., Ishida T., Arioka H., Kurokawa H., Fukuoka K., Nomoto T., Fukumoto H., Yokote H., Saijo N. (1996): Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Research* **16**, 3387-3395.
- Nobori T., Miura K., Wu D.J., Lois A., Takabayashi K., Carlson D.A. (1994): Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human gancers. *Nature* **368**, 753-756.
- Nutley B.P., Raynaud F.I., Wilson S.C., Fischer P.M., Hayes A., Goddard P.M., McClue S.J., Jarman M., Lane D.P., Workman P. (2005): Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse. *Molecular Cancer Therapeutics* **4**, 125-139.
- Oh^a C.H., Kim H.K., Lee S.C., Oh^b C., Yang B.S., Rhee H.J., Cho J.H. (2001): Synthesis and biological properties of C-2, C-8, N-9 substituted 6-(3-chloroanilino)purine derivatives as cyclin-dependent kinase inhibitors. Part II. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* **334**, 345-350.
- Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N. (1995): Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* **86**, 819-827.
- Otyeka M., Kryštof V., Havlíček L., Siglerová V., Strnad M., Koča J. (2000): Docking-based development of purine-like inhibitors of cyclin-dependent kinase-2. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 2506-2513.
- Oumata N., Bettayeb K., Ferandin Y., Demang L., Lopez-Giral A., Goddard M.L., Myrianthopoulos V., Mikros E., Flajolet M., Greengard P., Meijer L., Galons H. (2008):

- Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**, 5229-5242.
- Paprskářová M., Kryštof V., Jorda R., Džubák P., Hajdúch M., Strnad M. (2009): Functional p53 in Cells Contributes to the Anticancer Effect of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Roscovitine. *Journal of Cellular Biochemistry* **107**, 428-437.
- Park D.S., Farinelli S.E., Greene L.A. (1996): Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 8161-8169.
- Park D.S., Morris E.J., Greene L.A., Geller H.M. (1997): G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience* **15**, 1256-1270.
- Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N., Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M.P., Doll R., Nomeir A.A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E.M. (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 2344-2353.
- Paruch K., Dwyer M.P., Alvarez C., Brown C., Chan T.Y., Doll R.J., Keertikar K., Knutson C., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fischmann T.O., Hruza A., Madison V., Nomeir A.A., Wang Y., Lees E., Parry D., Sgambellone N., Seghezzi W., Schultz L., Shanahan F., Wiswell D., Xu X., Zhou Q., James R.A., Paradkar V.M., Park H., Rokosz L.R., Stauffer T.M., Guzi T.J. (2007): Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 6220-6223.
- Paruch K., Dwyer M.P., Alvarez C., Brown C., Chan T.-Y., Doll R.J., Keertikar K., Knutson C., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fishmann T., Hruza A., Madison V., Nomeir A.A., Wang Y., Kirschmeier P., Lees E., Parry D., Sgambellone N., Seghezzi W., Schultz L., Shanahan F., Wiswell D., Xu X., Zhou Q., James R.A., Paradkar V.M., Park H., Rokosz L.R., Stauffer T.M., Guzi T.J. (2010): Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**, 204-208.
- Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P., Tsai L.-H. (1999): Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.
- Phelps M.A., Lin T.S., Johnson A.J., Hurh E., Rozewski D.M., Farley K.L., Wu D., Blum K.A., Fischer B., Mitchell S.M., Moran M.E., Brooker-McEldowney M., Heerema N.A., Jarjoura D., Schaaf L.I., Byrd J.C., Grever M.R., Dalton J.T. (2009): Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **113**, 2637-2645.

- Pippin J.W., Qu Q., Meijer L., Shankland S.J. (1997): Direct *in vivo* inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *The Journal of Clinical Investigation* **100**, 2512-2520.
- Popowycz F., Fournet G., Schneider C., Bettayeb K., Ferandin Y., Lamigeon C., Tirado O.M., Mateo-Lozano S., Notario V., Colas P., Bernard P., Meijer L., Joseph B. (2009): Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 655-663.
- Porter P.L., Malone K.E., Heagerty P.J., Alexander G.M., Gatti L.A., Firpo E.J., Daling J.R., Roberts J.M. (1997): Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclinE, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Medicine* **3**, 222-225.
- Raillet V., Meijer L. (1991): A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Research* **11**, 1581-1590.
- Raynaud F.I., Whittaker S.R., Fischer P.M., McClue S., Walton M.I., Barrie S.E., Garrett M.D., Rogers P., Clarke S.J., Kelland L.R., Valenti M., Brunton L., Eccles S., Lane D.P., Workman P. (2005): In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clinical Cancer Research* **11**, 4875-4887.
- Roboz G.J., Khoury H.J., Shammo J.M., et al. (2012): Phase I dose escalation study of TG02 in patients with advanced hematologic malignancies. *Journal Of Clinical Oncology* **30** (Suppl.), Abstract: 6577.
- Rossi A.G., Sawatzky D.A., Walker A., Ward C., Sheldrake T.A., Riley N.A., Caldicott A., Martinez-Losa M., Walker T.K., Duffin R., Gray M., Crescenzi E., Martin M.C., Brady H.J., Savill J.S., Dransfield I., Haslett C. (2006): Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature Medicine* **12**, 1056-1064.
- Sausville E.A. (2002): Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in Molecular Medicine* **8**, S32-S37.
- Schang L.M., Phillips J., Schaffer P.A. (1998): Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *Journal of Virology* **72**, 5626-5637.
- Schang L.M. (2001): Cellular proteins (cyclin dependent kinases) as potential targets for antiviral drugs. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **12**, 157-178.
- Schow S.R., Mackman R.L., Blum C.L., Brooks E., Horsma A.G., Joly A., Kerwar S.S., Lee G., Shiffman D., Nelson M.G., Wang X., Wick H.M., Zhang X., Lum R.T. (1997): Synthesis and

- activity of 2,6,9-trisubstituted purines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**, 2697-2702.
- Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H.D., Morgan D.O., Meijer L., Veselý J., Kim S.-H. (1995): Crystal Structure of Cyclin-Dependent Protein Kinase 2 in Complex with ATP and Two Inhibitors, Olomoucine and Isopentenyladenine. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **22**, 378-391.
- Schwartz G.K., LoRusso P.M., Dickson M.A., Randolph S.S., Shaik M.N., Wilner K.D., Courtney R., O'Dwyer P.J. (2011): Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1). *British Journal of Cancer* **104**, 1862-1868.
- Sedláček H., Czech J., Naik R., Kaur G., Worland P., Losiewicz M., Parker B., Carlson B., Smith A., Senderowicz A., Sausville E. (1996): Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *International Journal of Oncology* **9**, 1143-1168.
- Senderowicz A.M. (2002): The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologist* **7**, 9-12.
- Serrano M., Hannon G.J., Beach D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707.
- Shah M.A., Schwartz G.K. (2006): Cyclin dependent kinases as target for cancer therapy. *Update on Cancer Therapeutics* **1**, 311-332.
- Shankland S.J. (1997): Cell-cycle control and renal disease. *Kidney International* **52**, 294-308.
- Sherr C.J., Roberts J.M., (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **9**, 1149-1163.
- Sherr C.J., Roberts J.M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes & Development* **13**, 1501-1512.
- Shum P.W., Peet N.P., Weintraub P.M., Le T.B., Zhao Z., Barbone F., Cashman B., Tsay J., Dwyer S., Loos P.C., Powers E.A., Kropp K., Wright P.S., Bitonti A., Dumont J., Borchering D.R., (2001): The design and synthesis of purine inhibitors of CDK2. III. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **20**, 1067-1078.
- Siemeister G., Lücking U., Wengner A.M., Lienau P., Steinke W., Schatz C., Mumberg D., Ziegelbauer K. (2012): BAY 1000394, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, with potent antitumor activity in mono- and in combination treatment upon oral application. *Molecular Cancer Therapeutics* **11**, 2265-2273.
- Smith P.D., Crocker S.J., Jackson-Lewis V., Jordan-Sciutto K.L., Hayley S., Mount M.P., O'hare M.J., Callaghan S., Slack R.S., Przedborski S., Anisman H., Park D.S. (2003): Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a Mouse Model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**, 13650-13655.

- Smolewski P. (2008): Terameprocol, a novel site-specific transcription inhibitor with anticancer activity. *IDrugs* **11**: 204–214.
- Trova M.P., Barnes K.D., Alicea L., Benanti T., Bielaska M., Bilotta J., Bliss B., Duong T.N., Haydar S., Herr R.J., Hui Y., Johnson M., Lehman J.M., Peace D., Rainka M., Snider P., Salamone S., Tregay S., Zheng X., Friedrich T.D. (2009a): Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 6613-6617.
- Trova M.P., Barnes K.D., Barford C., Benanti T., Bielaska M., Burry L., Lehman J.M., Murphy C., O'Grady H., Peace D., Salamone S., Smith J., Snider P., Toporowski J., Tregay S., Wilson A., Wyle M., Zheng X., Friedrich T.D. (2009b): Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 6608-6612.
- Tong W.G., Chen R., Plunkett W., Siegel D., Sinha R., Harvey R.D., Badros A.Z., Popplewell L., Coutre S., Fox J.A., Mahadocon K., Chen T., Kegley P., Hoch U., Wierda W.G. (2010): Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3015-3022.
- Toyota A., Katagiri N., Kaneco C. (1993): The Alkylation of 2-Amino-6-chloropurine with Alcohols by Mitsunobu Reaction for a Synthesis of Carbocyclic Guanosine Analogs. *Heterocycles* **36**, 1625-1630.
- Verdugo D.E., Cancilla M.T., Ge X., Gray N.S., Chang Y.-T., Schultz P.G., Negishi M., Leary J.A., Bertozzi C.R. (2001): Discovery of Estrogen Sulfotransferase Inhibitors from a Purine Library Screen. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 2683-2686.
- Vesely J., Havlíček L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J.-Y., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry* **224**, 771-786.
- Villerbu N., Gaben A.M., Redeuilh G., Mester J. (2002): Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *International Journal of Cancer* **97**, 761-769.
- Vincent I., Jicha G., Rosado M., Dickson D.W. (1997): Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *The Journal of Neuroscience* **17**, 3588-3598.
- Vít V. (2004): Buněčná proliferace a diferenciace, buněčný cyklus a jeho kontrola. *Urologické listy* **3/2004**, 5-10 www.prolekare.cz/pdf
- Wada M., Hosotani R., Lee J.U., Doi R., Koshiba T., Fujimoto K., Miyamoto Y., Tsuiji S., Nakajima S., Okuyama A., Imamura M. (1998): An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I,

- induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Research* **18**, 2559-2566.
- Wen Y., Yu W.H., Maloney B., Bailey J., Ma J., Marié I., Maurin T., Wang L., Figueroa H., Herman M., Krishnamurthy P., Liu L., Planel E., Lau L.F., Lahiri D.K., Duff K. (2008a): Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron* **57**, 680-690.
- Wen Y., Planel E., Herman M., Figueroa H.Y., Wang L., Liu L., Lau L.-F., Yu W.H., Duff K.E. (2008b): Interplay between Cyclin-Dependent Kinase 5 and Glycogen Synthase Kinase 3 β Mediated by Neuregulin Signaling Leads to Differential Effects on Tau Phosphorylation and Amyloid Precursor Protein Processing. *The Journal of Neuroscience* **28**, 2624-2632.
- Whitlock J.A., Krailo M., Reid J.M., Ruben S.L., Ames M.M., Owen W., Reaman G., Childrens Oncology Group Study (2005): Phase I clinical and pharmacokinetic study of flavopiridol in children with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 9179-9186.
- Whittaker S.R., Walton M.I., Garrett M.D., Workman P. (2004): The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Research* **64**, 262-272.
- Williamson D.S., Parratt M.J., Bower J.F., Moore J.D., Richardson C.M., Dokurno P., Cansfield A.D., Francis G.L., Hebden R.J., Howes R., Jackson P.S., Lockie A.M., Murray J.B., Nunns C.L., Powles J., Robertson A., Surgenor A.E., Torrance C.J. (2005): Structure-guided design of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**, 863-867.
- Wong A.S., Lee R.H., Cheung A.Y., Yeung P.K., Chung S.K., Cheung Z.H., Ip N.Y. (2011): Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nature Cell Biology* **13**, 568-579.
- Xu B., Kim S.-T., Kastan M.B. (2001): Involvement of BRCA1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing radiation. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3445-3450.
- Yamamoto H., Monden T., Miyoshi H., Izawa H., Ikeda K., Tsujie M., Ohnishi T., Sekimoto M., Tomita N., Monden M. (1998): Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells. *International Journal of Oncology* **13**, 233-239.
- Zaharevitz D.W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A.M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville L.A. (1999): Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Research* **59**, 2566-2569.
- Zhang J., Cicero S.A., Wang L., Romito-Digiorgio R.R., Yang Y., Herrup K. (2008): Nuclear localization of Cdk5 is a key determinant in the postmitotic state of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**, 8772-8777.

Zhu J.H., Guo F., Shelburne J., Watkins S., Chu C.T. (2003): Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathology* 13, 473-481.

Knižní zdroje:

Soural M., Hlaváč J., Krchňák V. (2010): Linkers for Solid-Phase Peptide Synthesis. In: *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. (Hughes A.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 273-312.

Patenty:

WO 2010/058006 A1 : Ciomei M., Scaburri A. (27. May 2010): CDK Inhibitor for the Treatment of Mesothelioma.

WO 2005/082908 A1: Guzi T.J., Paruch K. (9. Sep 2005): Pyrazolotriazines as kinase inhibitors.

WO 2009/034411 A1: Meijer L., Bettayeb K., Galons H., Demange L., Oumata N. (19. March 2009): Perharidines as CDK inhibitors.

WO 2008/151304 A1: Jogalekar A.S., Snyder J.P., Liotta D.C., Barrett A.G., Coombes R., Ali S., Siwicka A., Brackow J., Scheiper B. (11. Dec 2008): Selective inhibitors for cyclin-dependent kinases.

WO 2012014994 A1: Kakizuka A., Seiji H., Toshiyuki S., Tomohiro F. (2. Sep 2012): Preparation of 2-(arylo or heteroarylo)-4-aminonaphthalene-1-sulfonic acid derivatives as regulators of vasolin-containing protein (VCP).

Diplomové, disertační či habilitační práce:

Havlíček L. (2004): *Syntetické inhibitory Cyklin-dependentních kinas*. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.

Malínková V. (2013): *Příprava a biologická aktivita nových 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potenciální vyšší metabolickou stabilitou*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.

Nepublikované výsledky:

Havlíček L., Strnad M. : nepublikované výsledky.

Internetové zdroje:

A Phase 1b Study of LY2835219 in Combination with Endocrine Therapies for Patients with Hormone Receptor Positive, HER2 Negative Metastatic Breast Cancer. Available online: <https://clinicaltrials.gov/et2/show/NCT02057133?term=LY2835219&rank=5> (accessed on 25 July 2014)

A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Study of Fulvestrant with or without LY2835219, a CDK4/6 Inhibitor for Women with Hormone Receptor Positive (HR+), HER2 Negative (HER2-) Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02107703?term=LY2835219&rank=9> (accessed on 25 July 2014)

Parkinsonova choroba podle článku Nadace Michaela J. Foxe pro výzkum Parkinsonovy choroby. Zpracoval: Svršek J. <http://natura.baf.cz/natura/2005/7/20050701.html> (28.4.2015)

Phase II Study of Oral PHA-848 125AC in Patients with Thymic Carcinoma Previously Treated with Multiple Lines of Chemotherapy. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011439> (accessed on 22 July 2014)

Katedra organické chemie – Syntéza na pevné fázi a kombinatoriální chemie, Šmíd M. (2013): http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/?page_id=8522 (28.4.2015)

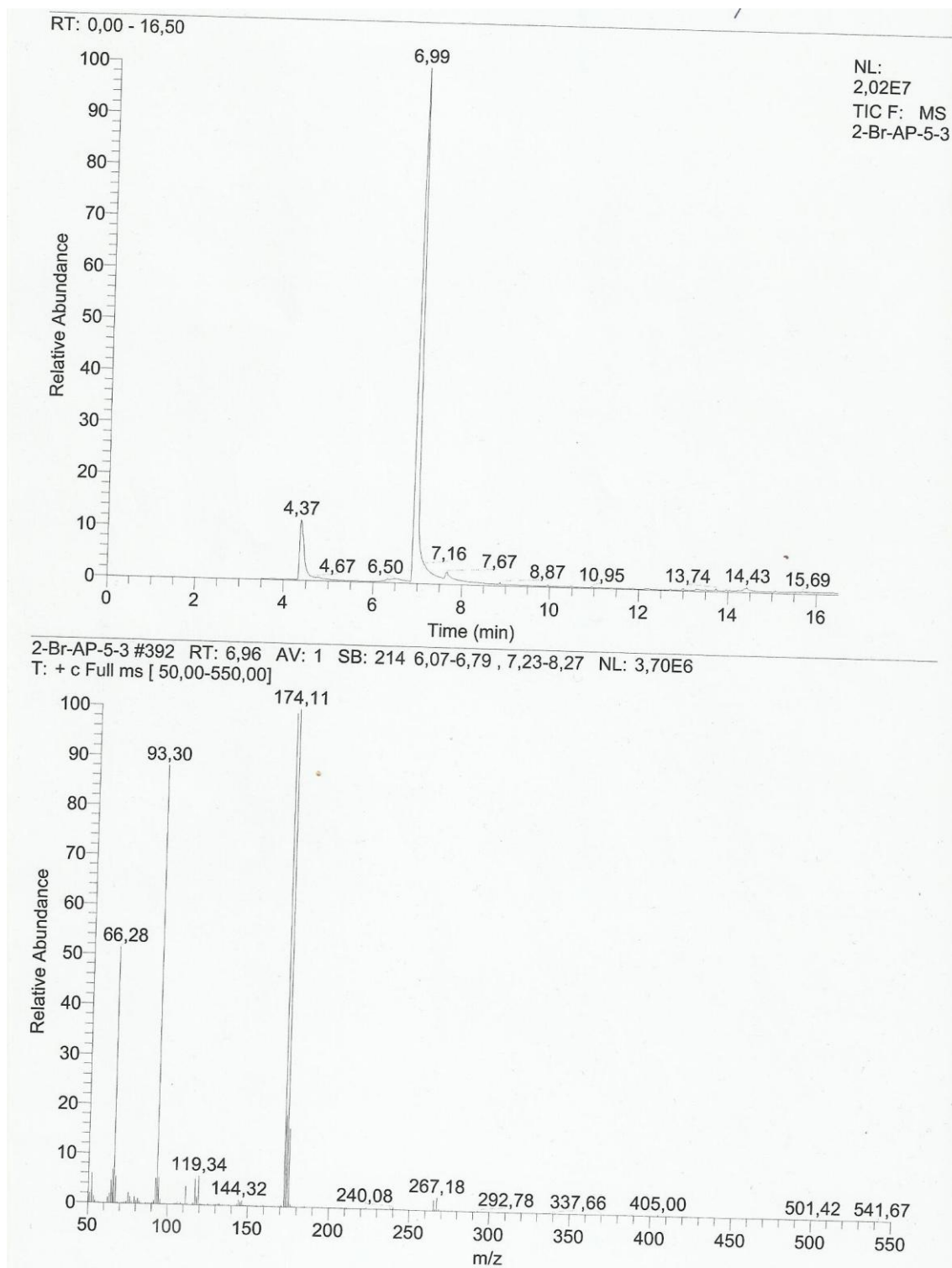
8 Seznam použitých zkratk

A β	Amyloid- β ta
AD	Alzheimerova choroba
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
ATP	Adenosintrifosfát
BACE1	Beta sekretasa 1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)
CAK	Cyklin-aktivační kinasa
cdc25	Fosfatasa buněčného cyklu specificky defosforující cyklin-dependentní kinasu
CDK/CDKs	Cyklin-dependentní kinasa/Cyklin-dependentní kinasu
CDKi	Inhibitory Cyklin-dependentních kinas
Cip/Kip	Přirozené inhibitory CDK (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein)
CK1	Kasein kinasa 1
CLL	Chronická lymfocitní leukémie
CML	Chronická myeloidní leukémie
CNS	Cévní nervová soustava
CRK	Cdc2-related kinase
cyc	Cyklin
DCM	Dichlormethan
DCP	Dichlorpurin
DEAD	Diethyl azodikarboxylát
DIAD	Diisopropyl azodikarboxylát
DIEA/DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DME	Dimethylether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP1	Transkripční faktor rodiny DP1
E2F	Transkripční faktor rodiny E2F regulující transkripci genů potřebných pro syntézu DNA
GC	Plynová chromatografie
GSK	Glykogen synthasa kinasa
IC ₅₀	Koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
I κ B/IKK	Nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
INK4	Přirozený inhibitor cyklin-dependentní kinasu 4
Hela	Buněčná linie lidských epiteliálních buněk
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HSV	Herpes Simplex Virus
MAOS	Mikrovlánně asistovaná organická syntéza
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Mediátorová ribonukleotidová kyselina
MW	Microwave
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nukleární magnetická rezonance
P	Fosforylace
P130, p107	„Kapesní“ proteiny
p53	Nádorový supresor
p65	Transkripční faktor p65 (RELA genu)
pRB	Retinoblastoma protein
PD	Parkinsonova choroba
PPh ₃	Trifenylfosfin
P-TEFb	(Positive transcription elongation factor b)
RNA	Ribonukleotidová kyselina
SAR	Vztah mezi strukturou a aktivitou (structure and activity relationship)
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TFIIH	Transkripční faktor RNA polymerasy II
Tat	Transaktivátor transkripce
UV	Ultrafialové

9 Přílohy

Příloha 1: GC-MS pro 6-brom-pyridin-3-amin.



Příloha 2: GC-MS pro 6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-amin.

