

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Studium syntézy a biologické aktivity nových  
heterospirocyclických potenciálních inhibitorů FLT3 kináz**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Autor:                  | <b>Bc. Braunová Nikola</b>      |
| Studijní program:       | N1501 Biologie                  |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie         |
| Forma studia:           | Prezenční                       |
| Vedoucí práce:          | <b>RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2018                            |

## Bibliografická identifikace

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. Nikola Braunová  |
| Název práce:             | Studium syntézy a biologické aktivity nových heterospirocyclických potenciálních inhibitorů FLT-3 kináz.   |
| Typ práce:               | Diplomová  |
| Pracoviště:              | Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Laboratoř růstových regulátorů  |
| Vedoucí práce:           | RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce:      | 2018   |
| Abstrakt:                | <p>Tato diplomová práce se v literární rešerši věnuje FLT3 kináze, popisuje její strukturu, funkci i mutace kinázy mající vliv na vznik leukémie a dalších malignit. Jsou zde pojmuty také FLT3 inhibitory ať už známé několik let či poměrně nedávno objevené. V druhé polovině rešerše se řeší méně známá problematika heterospirocyclických sloučenin. Počínaje od syntetických přístupů k vybraným heterospirocyclickým jádrům, fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti oxetanů a spirocyclických oxetanů, až po již konkrétní příklady biologicky aktivních látek obsahujících heterospirocyclická jádra jako substituent. V praktické části práce byla provedena několikastupňová syntéza heterospirocyclických prekurzorů, které následně byly substituovány na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9<i>H</i>-purin do polohy C<sup>6</sup>.</p> |
| Klíčová slova:           | FLT3 kináza, FLT3 inhibitory, myeloidní leukémie, oxetany, heterospirocyclické sloučeniny  |
| Počet stran:             | 104  |
| Počet příloh:            | 0  |
| Jazyk:                   | Český  |

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Nikola Braunová

Title: Study of synthesis and biological activity of new heterospirocyclic potential inhibitors of FLT-3 kinases.

Type of thesis: Master

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

Supervisor: RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract: This thesis is focused on the FLT3 kinase, describes its structure, function and kinase mutations which have an effect on onset of leukemia and the other malignancies. There are also described FLT3 inhibitors known for several years or relatively recently discovered. The second part of this thesis is solving the less known problematics of heterospirocyclic compounds. Starting from synthetic approaches to selected heterospirocyclic core, physicochemical and biological advances of oxetanes, including spirocycles to specific examples of hetero-spirocyclic core containing biologically active substances as a substituent. Experimental part involves multistep synthesis of heterospirocyclic precursors which were substituted on 2,6-dichloro-9-cyclopentyl-9*H*-purine to position C<sup>6</sup>.

Keywords: FLT3 kinase, FLT3 inhibitors, myeloid leukemia, oxetanes, heterospirocyclic compounds

Number of pages: 104

Number of appendices: 0

Language: Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele RNDr. Tomáše Guckého, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne .....

.....

Mé poděkování patří především mému školiteli panu RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za jeho odborné vedení, pochopení a cenné rady či poznatky během zpracování předkládané diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala panu RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. a Františkovi Škařupovi za velkou pomoc při vykonávání praktické části diplomové práce. Mé díky také patří kolegyním Mgr. Kristýně Vlkové, Mgr. Vlastě Matuškové a Bc. Růženě Pádrtové za neocenitelnou pomoc během práce v laboratoři při vykonávání syntetických postupů a vytvoření přátelského kolektivu. Mimo prostory laboratoře děkuji za výpomoc při měření NMR spekter Mgr. Noemi Bucharové, za kontrolu čistoty látek metodou HPLC\_MS děkuji Mgr. Haně Omamíkové, za otestování biologické aktivity látek děkuji Mgr. Evě Řezníčkové a dále děkuji celému kolektivu Laboratoří růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého.

## Seznam zkratek

|            |  |
|------------|--|
| Å          | ångström - jednotka délky chemických vazeb                                   |
| AKT        | proteinkináza B  |
| B-ALL      | akutní lymfoblastická leukémie vznikající v B-lymfocytární buněčné populaci  |
| BAD        | induktor buněčné smrti   |
| Bax        | apoptopický regulátor  |
| BCL-2      | antiapoptopický protoontogen   |
| c-KIT      | receptor faktoru kmenových buněk   |
| CDK        | cyklindependentní kináza   |
| CEBPA      | CCAAT/enhancer binding protein alpha   |
| CLL        | chronická lymfocytární leukémie  |
| CLP        | běžné lymfoidní progenitory  |
| CML        | chronické myeloidní leukémie   |
| CRB2       | growth factor receptor bound protein-2                                       |
| CREB       | protein vázající se v genomu na cyklickou adenosinmonofosfátovou jednotku    |
| CSF1R      | kolonie stimulující faktor   |
| CSF-1      | makrofágové kolonie stimulující faktor                                       |
| DC         | dendritické buňky  |
| DFG        | konzervativní prvek Asp-Phe-Gly  |
| DHPLC      | denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie                           |
| DIPEA      | <i>N,N</i> -diisopropyl- <i>N</i> -ethylamine, nebo také Hünigova báze       |
| ELK        | transkripční faktor, souvisí s formováním paměti, Alzheimerovou chorobou aj. |
| ERK1/2     | mimobuněčným signálem regulované kinázy 1 a 2                                |
| FL         | FLT3 ligand  |
| FLT3       | FMS - like tyrosine kinase 3   |
| FLT3-ITD   | mutace FLT3 způsobující interní tandemové duplikace                          |
| FLT3-JM-PM | aktivační mutace v juxtamembránové doméně                                    |
| FLT3-LM    | délkové FLT3 mutace  |
| FLT3-TKD   | mutace v aktivační smyčce intracelulární kinázové domény FLT3                |
| FLT3-WT    | wild type FLT3, fyziologická alela   |
| FMS        | receptor faktoru stimulujícího kolonie makrofágů                             |
| FoxO3      | transkripční faktor z rodiny "forkhead box", třída O                         |

|                |   |
|----------------|---|
| FOXO           | forkhead transkripční faktory   |
| GDP            | guanosindifosfát  |
| GTP            | guanosintrifosfát   |
| IL-6           | interleukin 6   |
| ITD            | interní tandemové duplikace   |
| JM             | juxtamembránová doména  |
| KIT            | růstový faktor kmenových buněk  |
| MDS            | myelodysplastický syndrom   |
| MM             | mnohočetný myelom   |
| mTOR           | savčí cíl rapamycinu  |
| NK buňky       | „natural killer“ buňky  |
| PDGF           | růstový faktor krevních destiček  |
| PDGFR          | receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček                  |
| PDGRF $\alpha$ | růstový destičkový faktor $\alpha$  |
| PDGRF $\beta$  | růstový destičkový faktor $\beta$   |
| PI3K           | fosfatidylinositol-3-kináza   |
| RAF            | akronym pro „Rapidly Accelerated Fibrosarcoma“                              |
| RAS            | protoonkoproteiny kódované genem c-ras                                      |
| Rb             | retinoblastomový protein  |
| RSK            | 90 kDa ribozomální S6 kináza  |
| RTKs           | v membráně vázané receptorové tyrosin kinázy                                |
| SAR            | vztah mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou látek               |
| SHP-1/2        | protein tyrosinové fosfatázy  |
| SH2            | SRC homologní 2 proteinová doména   |
| SH3            | SRC homologní 3 proteinová doména   |
| SHIP           | inositol fosfatáza obsahující SH2   |
| SOS            | Son of Sevenless – specifický guanine nucleotide exchange factor            |
| STAT           | signálního transduktor a aktivátor transkripčního faktoru                   |
| T-ALL          | akutní lymfoblastická leukémie vznikající v T-lymfocytární buněčné populaci |
| TEA            | triethylamin  |
| TK1 a TK2      | první a druhá tyrosin kinázová doména                                       |
| TKI            | inhibitor FLT3 tyrosinkinázy  |
| TLC            | tenkovrstevná chromatografie  |
| VEGFR-2        | vaskulární endoteliální růstový faktor 2                                    |

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Seznam zkratk .....   | 6  |
| 1. ÚVOD .....   | 9  |
| 2. CÍLE PRÁCE.....  | 11 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST .....  | 12 |
| 3.1 Biologický význam a funkce FLT-3 kinázy .....   | 12 |
| 3.1.1 Struktura FLT-3 kinázy.....   | 12 |
| 3.1.2 Funkce FLT-3 kinázy.....  | 15 |
| 3.1.3 Inhibitory FLT-3 kinázy, strukturní typy, selektivita, terapeutický potenciál .....             | 21 |
| 3.2 Syntetické přístupy k vybraným heterospirocyclickým jádrům.....                                   | 41 |
| 3.3 Farmakologický potenciál heterospirocycklů jako alternativních farmakoforů.....                   | 49 |
| 3.3.1 Obecné principy .....   | 49 |
| 3.3.2 Příklady využití heterospirocyclických látek pro úpravu vybraných biologických vlastností ..... | 54 |
| 4. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY .....  | 60 |
| 4.1 Syntéza klíčových prekurzorů .....  | 60 |
| 4.2 Syntéza cílových inhibitorů .....   | 69 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....  | 73 |
| 5.1 Materiál a metody.....  | 73 |
| 5.2 Syntéza klíčových prekurzorů .....  | 74 |
| 5.3 Syntéza cílových inhibitorů.....  | 83 |
| 6. ZÁVĚR .....  | 88 |
| 7. POUŽITÁ LITERATURA .....   | 89 |



# 1. ÚVOD

Neustálé pokroky v buněčné a molekulární biologii mění naše chápání normální hematopoézy. Přežití, proliferace a diferenciací patří mezi základní buněčné procesy, které definují normální hematopoetické buňky. Ovšem u akutní myeloidní leukémie (AML) rovnováhu mezi proliferací, přežíváním a diferenciací buněk narušují různé abnormality a heterogenní poruchy hematopoetických progenitorových buněk. Tyto abnormality způsobují expanzi abnormálního klonu kmenových buněk.

Mnoho studií za poslední roky dospělo k závěru, že leukemogeneze je proces, při němž se na vývoji maligního fenotypu podílí mnohočetné události zahrnující nezávislé genetické změny v protoonkogenních nebo supresorových genech spolu s epigenetickými nebo enviromentálními faktory (Irons a Stillman, 1996). Geny podílející se na leukemogenezi jsou spjaty s různými buněčnými funkcemi zahrnující interakce ligand-receptor, signální transdukci, intracelulární lokalizaci, kontrolu buněčného cyklu a apoptózu. Mutace, jež jsou základem nástupu leukémie, se rozdělují do dvou tříd. Mutace třídy I poskytují blastickým buňkám výhodu proliferace a přežití, typicky jakožto výsledek aberantní aktivace signalizačních cest. Mutace třídy II vedou k narušení diferenciací prostřednictvím interference s transkripčními faktory nebo koaktivátory. Kooperací mezi těmito hlavními třídami mutací vznikají leukemické buňky schopné proliferace, ale nikoliv diferenciací (Gilliland, 2002).

Mutace uvnitř genu FMS-like tyrosin kinázy 3 (FLT3) představují jednu z nejčastějších genetických změn, které narušují signalizační dráhy hrající roli při patogenezi leukémie. FLT3 je členem rodiny třídy III receptorové tyrosinkinázy, kam se také řadí receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (PDGFR), receptor faktoru stimulujícího kolonie makrofágů (FMS) a receptor faktoru kmenových buněk (c-KIT). S těmito receptory sdílí stejnou strukturu. Mezi nejčastější molekulární abnormality pozorované v krevních buňkách pacientů s AML spadají aktivační mutace v genu FLT3 včetně interních tandemových duplikací (ITD) a mutací v aktivační smyčce intracelulární kinázové domény (TKD). Tyto mutace vedou k nadměrné expresi nebo konstitutivní aktivaci tyrosinkinázového receptoru (Motyckova a Stone, 2010). Studie naznačují, že pacienti s mutací FLT3 mívají horší prognózu na rozdíl od pacientů bez změn v genu FLT3. Zejména přítomnost interní tandemové mutace FLT3 (FLT3-ITD) přímo koreluje se zvýšeným rizikem relapsu a narušením celkové doby přežití. Navíc AML s mutacemi FLT3-ITD se pravděpodobně vyskytuje převážně *de novo* než vlivem sekundárních příčin a je pravděpodobnější u pacientů s vyšším počtem bílých krvinek

(Mrózek et al., 2007). Vliv mutace v aktivační smyčce intracelulární kinázové domény FLT3 (FLT3-TKD) na prognózu AML není stále zcela jasný (Motyckova a Stone, 2010).

Kromě cytogenetických abnormalit zjištěných při diagnóze, které jsou samozřejmě nejdůležitějším prognostickým faktorem, jsou mimo jiné také mutace FLT3 významným nezávislým faktorem, jenž může ovlivnit výsledek z hlediska přežití a trvání kompletní remise, a to i u pacientů s normálním karyotypem. A proto aberantně aktivovaná FLT3 kináza je považována za velmi atraktivní terapeutický cíl a pro léčbu AML byly vyvinuty specifické malé molekuly inhibitorů FLT3 tyrosinkinázy (TKI) a již mnoho let jsou zkoumány v naději, že mohou vést k revoluci v léčbě AML (Gilliland et al., 2004).

U již známých FLT3 inhibitorů se i přes veškerá pozitiva objevují problémy s toxicitou a omezená účinnost těchto léčiv, a přestože byly objeveny specifické inhibitory, stále se řeší problémy ohledně získané rezistence. Byly proto vyvinuty nové 2,6,9-trisubstituované purinové deriváty s účinnou inhibiční FLT3 aktivitou, obsahující ve své struktuře mimojiné heterospirocyclická jádra (Gucký et al., 2018).

V současné době je zájem o spirocyclické oxetany a obecně heterospirocyclická jádra z důvodu, že představují zajímavý motiv, nabízející možnou modulaci fyzikálně-chemických vlastností (Carreira a Fessard, 2014). Pozornost na oxetany padla zejména díky tomu, že jejich zavedení může mít příznivý vliv na rozpustnost, metabolickou stabilitu a lipofilnost sloučeniny a také na acidobazické vlastnosti cílové molekuly (Wuitschik et al., 2006).

Na základě těchto žádaných vlastností oxetanů je o ně velký zájem ve farmaceutickém průmyslu. Často se používají jako bioisostery a mění fyzikálně-chemické vlastnosti sloučenin podobným některým léčivům (Meanwell 2011).

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce je syntéza vybraných nových inhibitorů FLT-3 kinázy 2,6,9-trisubstituované purinové řady, které nesou ve vybraných pozicích heterospirocyclická jádra (homospiromorfolin). Práce zahrnuje vícestupňovou syntézu navržených látek, včetně klíčových prekurzorů, studium jejich struktury základními metodami organické strukturní analýzy a vyhodnocení základních biologických dat s navržením případných dalších možností práce na tomto poli.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

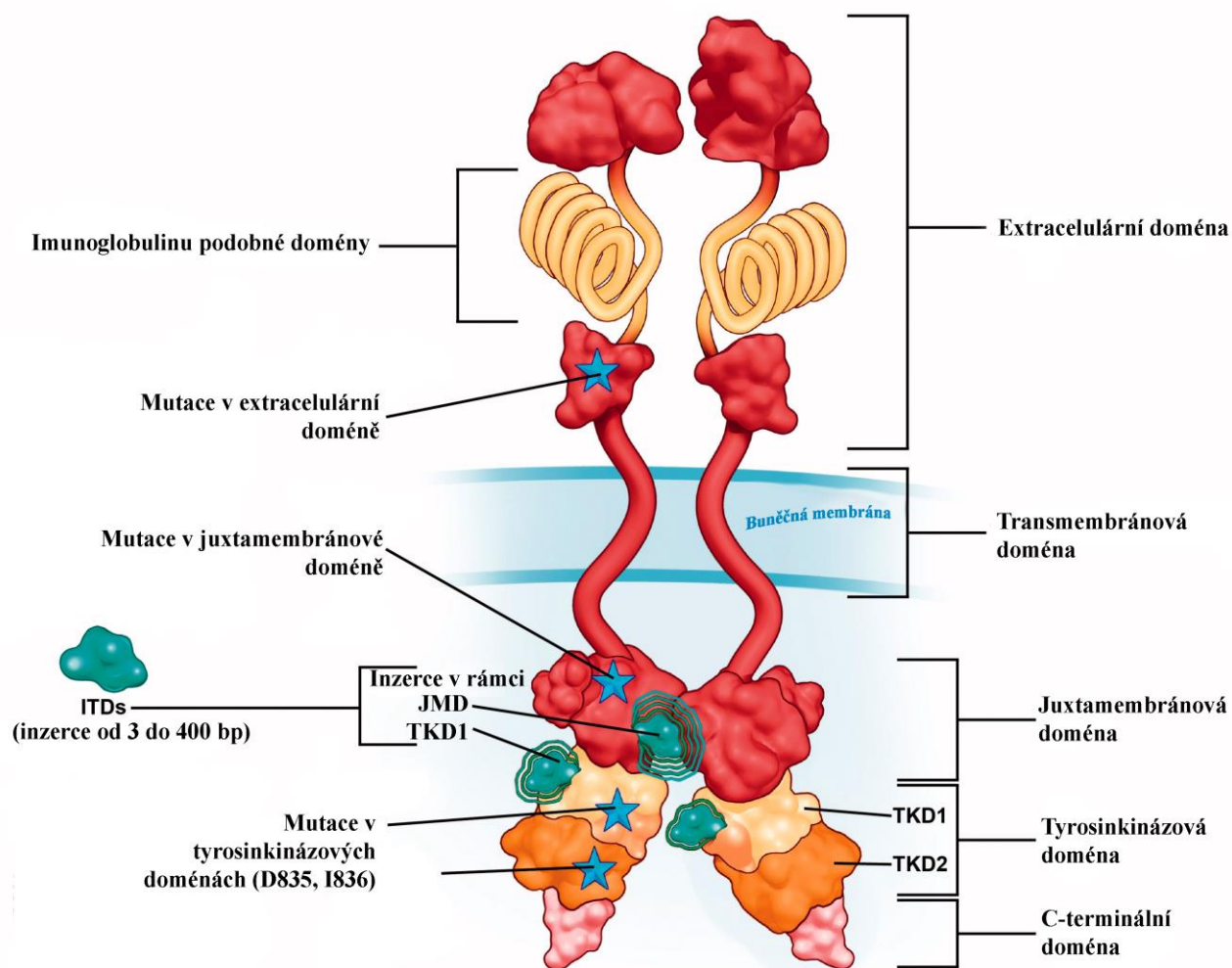
### 3.1 Biologický význam a funkce FLT-3 kinázy

#### 3.1.1 Struktura FLT-3 kinázy

Gen pro FMS-like tyrosin kinázu 3 (FLT3) je lokalizován na chromozómu 13, přesněji na jeho dlouhém rameni (13q12). Tento gen se skládá z 24 exonů a jeho velikost odpovídá přibližně 96 kb. Přesná velikost není známa především kvůli přítomnosti velkého intronu (>50 kb) Jeho proteinový produkt je tvořen 993 aminokyselinami s molekulovou hmotností 155 až 166 kDa. Výsledná posttranslační glykosylace umožňuje vazbu na membránu. (Carrow et al., 1995; Agnès et al., 1994).

FLT3 spadá do rodiny III. třídy v membráně vázaných receptorových tyrosin kináz (RTKs). Patří zde rovněž strukturně podobné receptory pro růstový faktor kmenových buněk (c-KIT), kolonie stimulující faktor (CSF1R) anebo také receptory růstového destičkového faktoru (PDGFR $\alpha$  a PDGFR $\beta$ ). Spolu s nimi přispívá ke správné diferenciaci a proliferaci hematopoetických buněk (Griffith et al., 2004). FLT3 je primárně exprimován na myeloidních a lymfoidních progenitorech a jeho exprese byla popsána v orgánech jako jsou játra, slezina, thymus a placenta (Rosnet et al., 1993; Stewart D et al., 1998).

Z hlediska struktury se FLT3 receptor skládá ze čtyř částí (**Obr. 1**) a to z *N*-terminální extracelulární oblasti sestávající z pěti imunoglobulinu podobných domén. Tři z nich, nejvíce distálně umístěné od plazmatické membrány, jsou zapojeny do vazby ligandu FLT3 (FL), zatímco proximální domény se zapojují do dimerizace receptoru. Následuje transmembránová doména, k níž přiléhá intracelulární doména, taktéž nazývána jako juxtamembránová doména (JM). Poslední koncová tyrosin kinázová doména (TKD) se rozděluje díky hydrofilnímu inzertu na dvě části - první a druhou tyrosin kinázovou doménu (TK1 a TK2) (Griffith et al., 2004; Agnès et al., 1994).



**Obr. 1: Stavba FLT3 receptoru:** Schématické znázornění FLT3 receptoru skládajícího se z pěti funkčních domén – extracelulární domény zahrnující 5 imunoglobulinu podobných domén, transmembránovou doménu, juxtamembránovou doménu (JM), tyrosinkinázovou doménu 1 a 2 a koncovou C-terminální doménu. Obrázek také orientačně zachycuje interní tandemové duplikace (ITD) jakožto nejčastější mutace, dále mutace v tyrosinkinázové doméně (TKD) a ve velmi malém počtu případů identifikované mutace v extracelulární doméně (převzato a upraveno z Patnaik, 2017).

Jak již bylo zmíněno výše, extracelulární oblast je vysoce glykosylovaná a zahrnuje vazebnou doménu s vysokou afinitou pro svůj ligand. Míst určených pro glykosylaci je hned několik. U myších a lidských FLT3 receptorů bylo nalezeno 9 až 10 potenciálních míst pro *N*-vázanou glykosylaci (Lyman a Jacobsen, 1998). Zatímco neglykosylovaná izoforma má molekulovou hmotnost 130 až 143 kDa a není spojená s plazmatickou membránou (Markovic et al., 2005).

V nestimulovaném stavu se receptor FLT3 nachází v monomerní, nefosforylované formě s neaktivní kinázovou skupinou. Po interakci receptoru s FLT3 ligandem (FL),

receptor podstupuje konformační změnu, aktivuje se formace homodimeru a JM domény se transfosforylují na tyrosinech Y589 a Y591. Dochází díky konformační změně k rozvinutí receptoru a odhalení akceptorového místa pro fosfát na tyrosinkinázových doménách. Aktivita kinázy je negativně modulována tyrosin fosfatázami, které defosforylují tyrosiny na nenavázané JM doméně. To dovoluje JM doméně zaujmout svou autoinhibiční konformaci. Expozice FL je rozhodujícím krokem při regulaci aktivity receptoru. FL je transmembránový protein typu I a člen malé rodiny růstových faktorů, které stimulují proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk (Dosil et al., 1993; Griffith et al., 2004; Tsapogas et al., 2017). Existují tři známé izoformy FL. První je 30 kDa glykoprotein se čtyřmi transmembránovými alfa-helixy, aminoterminální doménou a malou cytoplazmatickou oblastí představující exprimovanou formu vázající se na receptor, čímž ho aktivuje. Druhým typem je rozpustná a biologicky aktivní forma ligandu, jenž vznikla štěpením transmembránové izoformy. A poslední představuje rozpustnou formu vytvořenou alternativním sestřihem, který vytváří předčasný stop kodón (Griffith et al., 2004).

Jak již bylo zmíněno výše, FL hraje klíčovou roli během proliferace a diferenciaci myeloidních a lymfoidních progenitorů, což dokazují studie u myší, kdy byl zkoumán vliv nedostatku FL na hematopoézu. Tento nedostatek měl negativní dopad vedoucí k nedostatečné hematopoéze, postihující primárně „natural killer“ buňky (NK buňky), dendritické buňky (DC) a běžné lymfoidní progenitory (CLP) (Parigi et al., 2018).

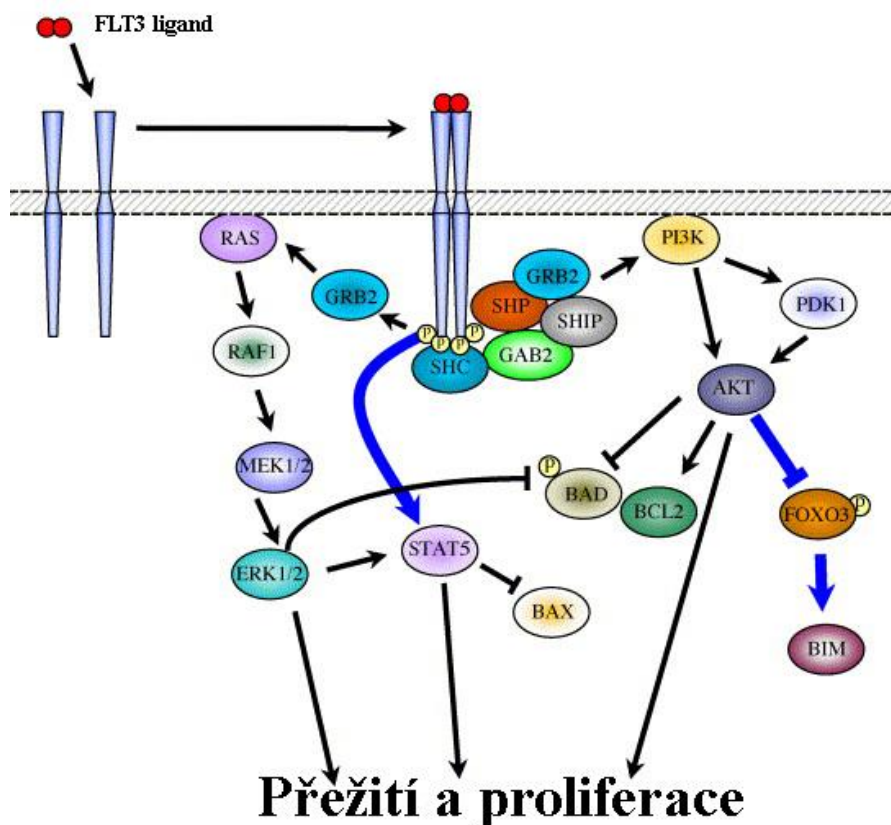
Podářilo se izolovat lidský homolog myšího genu FL a ukázalo se, že tento protein je biologicky aktivní v primitivních lidských hematopoetických buňkách. Mimo jiné také lidský FL je ze 72 % identický na úrovni aminokyselin s myším proteinem a zachovává si tak mnoho vlastností myšího proteinu včetně glykosylačních míst (Lyman et al., 1994; Lyman a Jacobsen, 1998). Exprese FL byla dokázána v mnoha tkáních a orgánech. Počínaje od sleziny, thymu, periferní krve, kostní dřeni až po prostatu, vaječníky, ledviny, plíce, tlusté střevo, tenké střevo, varlata, srdce, placentu a buňky cévního endotelu (Lyman et al., 1993; Lyman et al., 1994; Yonemura et al., 1997; Kokonozaki et al., 2015). Vysoké hladiny FL jsou spjaty s řadou onemocnění. Příkladem může být mnohočetný myelom (MM) jakožto maligní nádorové onemocnění plazmatických buněk, kdy dochází k hromadění abnormálních buněk v kostech a v důsledku toho vznikají léze způsobující patologické zlomeniny. Hromadit se mohou také v kostní dřeni a znemožňují tak normální produkci krevních buněk tvorbou osteolytických ložisek. Přítomnost vysokých hladin FL v kostní dřeni a v periferní krvi je spojena s progresí tohoto onemocnění a prahové hodnoty  $> 92$  pg/ml v kostní dřeni a  $> 121$  pg/ml v periferní krvi poukazují na recidivující

nebo refrakterní pacienty s MM. Potvrzují to navíc studie zkoumající hladiny rozpustného FL v kostní dřeni, kdy množství FL bylo mnohonásobně vyšší u pacientů před léčbou s aktivním MM než ve srovnání s pacienty již po léčbě. MM zůstává nevyлéčitelným onemocněním i přes zavedení nových látek či protilátek do léčby. Přesto celkové přežití bez progresu se v důsledku moderních terapií výrazně zlepšilo (Kokonozaki et al., 2015; Steiner et al., 2017).

FL jakožto transmembránový protein typu I, může být uvolňován jako rozpustný homodimerní protein. Jak membránově vázané, tak i rozpustné formy FL mohou aktivovat tyrosinkinázovou aktivitu receptoru a stimulovat růst progenitorových buněk v kostní dřeni a krvi. Nicméně aktivita FL je minimální, když působí samostatně. FL sám neindukuje efektivně proliferaci normálních myeloidních a lymfoidních progenitorů, ale silně synerguje s řadou jiných hematopoetických růstových faktorů a interleukinů. Příkladem jsou studie dokazující synergii FL s interleukinem 6 (IL-6) (Ebihara et al., 1997). Při AML, stimulace FLT3 receptoru jeho ligandem, zapříčiní proliferaci a přežívání leukemických blastů. Hematopoetické progenitory mohou být stimulovány lokální sekrecí FL nebo přímým kontaktem s FL exprimovaným na povrchu mononukleárních buněk, což naznačuje možnost kontroly aktivace FLT3 pomocí parakrinní smyčky nebo autokrinní zpětné vazby (Lyman a Jacobsen, 1998).

### 3.1.2 Funkce FLT-3 kinázy

Role FLT3 kinázy je velmi rozmanitá a zahrnuje jak důležité regulační procesy hematopoetických buněk včetně metabolismu fosfolipidů, tak i transkripci, proliferaci, apoptózu a také se podílí na leukemogenezi. Nemutovaný FLT3 (wild type; FLT3-WT) aktivuje například signální transdukční dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a kaskády RAS (**Obr. 2**). Tyto kaskády vedou k aktivaci proteinkinázy B (AKT), signálního transduktoru a aktivátoru transkripčního faktoru (STAT) a také k aktivaci mimobuněčným signálem regulované kinázy 1 a 2 (ERK1/2). Avšak vzhledem k četným studiím zůstávají signalizační cesty FLT3 nejasné (Fakih et al., 2018).



**Obr. 2: Signální kaskáda FLT3:** Signály generované FLT3 ligandem indukují dimerizaci receptoru FLT3 a vyvolávají jeho fosforylaci a následnou aktivaci intracelulárních kináz. Signalizační kaskáda je přenášena zejména cestami PI3K a RAS, což vede k aktivaci AKT, ERK1/ERK2 a STAT. Zdá se, že FLT3 se neváže přímo na podjednotku PI3K zvanou p85, ale tvoří komplex s jinými proteiny jako jsou SHC, SHP, SHIP, GRB2 a GAB2, které pak působí na RAS a PI3K dráhy. Funkce pro přežití FLT3 může být zprostředkována fosforylací proapoptopického BAD proteinu indukci antiapoptopického BCL-2 nebo prevencí indukce proapoptopického Bax. FLT3 s ITD mutací iniciuje aktivaci cest RAS a PI3K podobným způsobem, přičemž STAT5 může hrát důležitou roli v signalizaci FLT3-ITD. Také bylo prokázáno, že FLT3-ITD inhibuje funkci transkripčního faktoru Foxo3, čímž inhibuje indukci proapoptopického Bim proteinu. Cesty považující za přednostně aktivované díky mutacím FLT3-ITD jsou zobrazeny modře (převzato z Markovic et al., 2005).

Aktivací PI3K (první zmiňovaná dráha) dojde k přenosu  $\gamma$ -fosfátu na třetí hydroxylovou skupinu fosfatidylinositolu, aktivuje se tím AKT jakožto enzym, zamezující apoptóze a regulující buněčný cyklus. PI3K dále fosforyluje 289 kDa serin/threonin kinázu - savčí cíl rapamycinu - (mTOR), jenž za pomoci ribozomálního proteinu S6 a kinázy p70<sup>S6K</sup> má vliv na růst buňky, přežívání a její proliferaci (Martelli et al., 2010). Aberantní aktivace dráhy PI3K/AKT/mTOR ovšem naopak podporuje proliferaci a přežívání



maligních buněk a také je spojována s chemoterapeutickou rezistencí (Altman et al., 2011; Lindblad et al., 2016). Vzhledem k tomu, že p70<sup>S6K</sup> reguluje translaci proteinů, tak její aktivace vede ke zvýšení celkové syntézy proteinů a indukci přežití buněk (Martelli et al., 2010). Kromě toho aktivace AKT blokuje apoptózu fosforylací proapoptopického proteinu BAD (BCL-2 antagonistu buněčné smrti). Přežití buněk tedy FLT3 zprostředkovává fosforylací BAD na serinu 136, indukci antiapoptopického BCL-2 a prevencí indukce a aktivace proapoptopického Baxu (Kim et al., 2006). Mezi další důležité cíle AKT patří transkripční faktor FoxO3, člen rodiny FOXO transkripčních faktorů podílejících se na lipidovém metabolismu. FoxO3 se podílí na transkripci apoptózy a regulačních genů buněčného cyklu a fosforylací těchto faktorů AKT inaktivuje jejich funkci (Yang a Hung, 2009).

Druhá zmiňovaná kaskáda RAS souvisí s aktivním FLT3, který se váže s adaptorovým proteinem (GRB2) a umožní tím aktivaci G-proteinu RAS. GRB2 protein obsahuje SH3 doménu schopnou vázat ostatní proteiny bohaté na prolin jakým je protein SOS. Ten stimuluje disociaci guanosindifosfátu (GDP) a následnou vazbu guanosintrifosfátu (GTP) na RAS. To vede k aktivaci RAS, schopného v tomto stavu vázat serin/threoninovou kinázu RAF. Aby došlo k aktivaci proteinů ERK 1/2, je třeba fosforylace mitogenem aktivované proteinkinázy 1 a 2 (MEK 1/2) právě kinázou RAF. Aktivací RAS se tedy stimulují efekторы RAF, ERK kináza a 90 kDa ribozomální S6 kináza (RSK), esenciální v procesu translace a tyto efekторы aktivují protein vázající se v genomu na cyklickou adenosinmonofosfátovou jednotku (CREB), transkripční faktor (ELK) a STAT vedoucí k transkripci genů zapojených do proliferace. Řada studií zkoumajících velké podskupiny pacientů s vysokým rizikem akutní lymfoblastické leukémie (ALL) ukázala, že mutace ovlivňující dráhu RAS jsou hlavními ukazateli onemocnění ve významném podílu vysoce rizikových případů (Zhang a Broxmeyer, 2000; Martelli et al., 2010; Mansur et al., 2017).

Aktivita PI3K, jakožto enzymu přenášejícího v buňce fosfor a tím ovlivňujícího celou řadu dějů, je pravděpodobně regulována různými interakcemi mezi FLT3, adaptérovými proteiny SHC a jedním nebo více proteiny SHIP (inositol fosfatáza obsahující SH2). Právě zmiňovaný protein SHIP nese velmi důležitou roli týkající se množení a přežívání leukocytů. U nemocných pacientů tento protein aktivuje PI3K, přičemž dlouhodobější aktivace PI3K vede v mnoha případech k leukémii, mnohočetným myelomům či lymfomům. Také bylo prokázáno, že savčí protein tyrosin fosfatázy (SHP-1 a SHP-2), obsahující taktéž dvě domény SH2, se podílejí na signalizačních drahách růstového a cytokininového receptoru včetně receptoru PDGF a CSF-1. SHP-1

se v krvetvorných buňkách váže na aktivní receptor c-kit a asociuje s receptorem PDGF v nehematopoetických buňkách. Nadměrná exprese SHP-1 potlačuje proliferaci buněk, kterou indukoval CSF-1. Na rozdíl od SHP-1, hrající převážně negativní roli při modulaci signalizace pomocí růstového faktoru a cytokininových receptorů, tak je zřejmé, že SHP-2 je spíše pozitivním mediátorem. SHP-2 se může vázat přímo na aktivovaný receptor PDGF a receptor c-kit a také na GRB2, přičemž je fosforylován jakožto odpověď na vazbu ligandu (Zhang et al., 1999). Do určité doby nebylo známo zapojení proteinů z rodiny Gab do signalizace FLT3. Studie, navazující na předchozí, dokázala, že proteiny GAB1 a GAB2 jsou substráty pro SHP-2 a interagují s p85 (podjednotka PI3K) a SHP-2 pouze po stimulaci FL. Předpokládá se také, že SHP-2 s navázanými GAB1/2, může tyto proteiny defosforylovat a tím snížit interakci s SHP-2 či p85. Oba GAB1/2 jsou prokazatelně asociovány s GRB2 a SHC. Ovšem, zda se váží přímo na SHC nebo je vazba zprostředkována přes GRB2, je třeba ještě určit (Zhang a Broxmeyer, 2000).

FLT3-WT je exprimován ve vysokých hladinách u mnoha hematologických malignit a to u 93 % případů AML, u téměř 100 % akutní lymfoblastické leukémie vznikající v B-lymfocytární buněčné populaci (B-ALL), také v 87 % případů akutní lymfoblastické leukémie vznikající v T-lymfocytární buněčné populaci (T-ALL) a v malém procentu u myelodysplastického syndromu (MDS) a chronické lymfocytární leukémie (CLL). U chronické myeloidní leukémie (CML) není patrně exprimován (Kottaridis et al., 2003). Vysoká procenta dokazují studie zkoumající zvýšenou expresi FLT3, kdy byla potvrzena u leukemických blastů u 18 z 22 pacientů AML a u 3 z 5 případů ALL. Nebo také vyšší exprese FLT3 RNA byla nalezena v kostní dřeni ve 33 liniích z 33 u B-ALL, u 11 z 12 případů AML a 3 z 11 pacientů s T-ALL (Carrow et al., 1996). Nadměrná exprese FLT3 tedy hraje významnou roli v přežívání a proliferaci leukemických buněk. Mimo jiné leukemické klonogenní buňky FL vykazují určitý stupeň stimulační aktivity při stimulaci růstovými faktory jako například G-CSF, GM-CSF, IL-3. V 90 % případů byly tyto buňky schopny klonálního růstu (Piacibello et al., 1995). Tato abnormální exprese při kombinaci s expresí FL může dokonce vést ke konstitutivní aktivaci receptoru, i bez přítomnosti ligandu a dochází tím k deregulaci buněčného cyklu a vzniku maligních buněk (Armstrong et al., 2003). Jiné studie dokazují, že zvýšená exprese FLT3-WT u leukemických blastů může být spojena s horší prognózou. Výsledek přinesla analýza pro celkové přežití, kdy sice nadměrná exprese měla tendenci být horším prognostickým faktorem, i když nebyl statisticky významný (Ozeki et al., 2004).

V posledních několika letech bylo prokázáno, že somatické aktivační mutace FLT3 genu jsou nejběžnějšími genetickými abnormalitami u AML a mají významný dopad na prognózu. Přibližně u 30 % případů pacientů s AML jsou nalezeny aktivační mutace genu FLT3 (Weisberg et al., 2018). U pacientů s AML byly identifikovány dva hlavní typy aktivačních mutací. Prvním typem jsou bodové substituční, krátké deleční či inzerční mutace v oblasti tyrosinkinázové domény (FLT3-TKD). Druhým typem jsou délkové mutace (FLT3-LM) v oblasti kódující JM domény, určenou inzercí opakovaných aminokyselinových kyselin. Pod délkové mutace spadají interní tandemové duplikace (FLT3-ITD). Tyto mutace jsou nejčastěji lokalizovány dle starších záznamů v exonu 11, ale není výjimkou, když zasahují do intronu 11 a exonu 12 (Schnittger et al., 2002). Novější studie již uvádějí exon 14 a 15 kódující JM domény (Kottaridis et al., 2003; Meshinchi a Appelbaum, 2009). Tyto duplikace jsou vždy násobky tří a ve zmíněných exonech zachovávají čtecí rámeček. Délka duplikací se pohybuje od 3 do více než 400 páru bazí a v podstatě se jedná o vkládání opakovaných aminokyselinových sekvencí do proměnných pozic JM a zároveň není možné místa duplikací identifikovat za pomoci běžných cytogenetických metod. Často také dochází k vložení dalších 3 nebo 6 párů bazí neznámého původu, které vedou k přidání jedné nebo dvou nových aminokyselin před opakovanou oblast. Výsledkem ITD je dimerizace nezávislá na ligandu a aktivace kinázové domény konstitutivní fosforylací (Brown a Small, 2004). v JM doméně existují i aktivační mutace (FLT3-JM-PM), vyskytující se také u pacientů s AML. Také vedou ke konstitutivní fosforylaci, ale jejich biologická a klinická úloha stále zůstává neobjasněna (Gianfelici et al., 2011). Velká část ITD mutací se vyskytuje v karboxyterminální oblasti domény v exonu 14. Přesto výskyt mutací není omezen pouze na JM doménu. Dokazuje to studie, do níž bylo zahrnuto 753 AML pacientů s FLT3-ITD a překvapivě u 216 pacientů (28,7 %) byly ITD mutace identifikovány v tyrosinkinázové doméně (Breitenbuecher et al., 2009).

Několik studií zaznamenalo při mutaci FLT3-ITD konstitutivní aktivaci důležitých drah jako STAT5 nebo RAS/MAPK, které jsou za normálních podmínek aktivovány nativním FLT3 jakožto odezva na expozici FL. Také byl zkoumán růst hematopoetických myších buněčných liniích 32D a Ba / F3, které jsou běžně závislé na IL-3. Ovšem při FLT3 - ITD mutacích buňky rostly i bez příslušných růstových faktorů (Mizuki et al., 2000; Hayakawa et al., 2000). Nemutovaná forma FLT3-WT receptoru v JM doméně má konformaci  $\alpha$ -helixu, která blokuje aktivaci kinázy a může inhibovat vlastní dimerizaci. ITD mutace však zabraňují jakémusi ochrannému spojení mezi JM doménou a kinázou, což ji vystavuje konstitutivní aktivaci (Kottaridis et al., 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, exprese FLT3-ITD v buňkách Ba / F3 vede k aktivaci AKT a k souběžné fosforylaci FoxO3. Fosforylace FoxO3 na threoninu 32 podporuje jeho translokaci z jádra do cytoplazmy. Konkrétněji exprese FLT3-ITD zabraňuje apoptóze zprostředkované FoxO3, což naznačuje, že onkogenní tyrosinkináza může negativně regulovat transkripční faktory a tím potlačovat funkci FoxO3. To podporuje přežití a proliferaci buněk AML (Scheijen et al., 2004). Ačkoliv několik relativně účinných inhibitorů zaměřených na FLT3 zlepšuje klinické výsledky u pacientů s FLT3-ITD, střední doba přežití je přibližně jeden rok. Jednou z hlavních příčin selhání léčby je získaná rezistence na léky (Choi et al., 2018). Celkově jsou identifikovány mutace v genu FLT3 zhruba u 40 % pacientů s AML. Konkrétněji u dospělých s *de novo* AML to je 20-30 % případů nesoucích mutaci FLT3-ITD a s mutací FLT3-TKD 7-12 % pacientů. U dětí je výskyt FLT3-ITD nižší. Počet případů je uveden do 16 %, přičemž procento výskytu stoupá s věkem. Přesto již okolo deseti let se výskyt mutací u dětí vyrovná procentu u dospělých. Vyplývá to ze studie, kdy z 58 dětských případů AML a mutacemi FLT3-ITD bylo 39 ve věku deseti let a starších. Ovšem u populace dospělých pacientů patrně neexistuje žádná korelace mezi věkem pacienta a stavem mutace FLT3 (Levis a Small, 2003).

Druhým typem mutací nalezených v receptoru FLT3 jsou mutace spočívající v nahrazení aminokyselinového zbytku v tyrosinkinázové doméně (TKD). Tyto substituce jsou způsobeny bodovými mutacemi exonu 20 zahrnujícími kodony kyseliny asparagové 835 (D835) a isoleucinu 836 (I836) (Yamamoto et al., 2001; Mills et al., 2005). V samotném kodonu D835 bylo nalezeno nejméně pět různých substitucí. Převážně v tyrosinu (D835Y) dané mutacemi GAT → TAT, méně časté v histidinu (D835H) dané mutací GAT → CAT, ve valinu (D835V) typické mutací GAT → GTT, v kyselině glutamátové (D835E) a v asparaginu (D835N) (Scholl et al., 2005). Kromě toho přibližně do 5 % *de novo* AML obsahuje mutaci v exonu 20, která vede k vložení glycinu a serinu mezi aminokyseliny 840 a 841. U pacientů s cytogenetickými abnormalitami, u kterých byl zaznamenán relaps, bylo nalezeno nahrazení tyrosinu cysteinem 842 (Y842C) a nahrazení asparaginu 841 isoleucinem (N841I). A právě tato N841I mutace vede k aktivaci FLT3 receptoru, který je vysoce citlivý na FLT3 inhibitor PKC412 (Jiang et al., 2004). Pouze výjimečně byly identifikovány inserce nukleotidů kódujících tyrosinkinázovou doménu. Když je receptor neaktivní, tak aktivační smyčka brání přístupu ATP a substrátu do kinázové domény. TKD mutace interferují s inhibičním účinkem smyčky a vedou ke konstitutivní aktivaci kinázy, čímž dochází k proliferaci nezávislé na růstovém faktoru prostřednictvím již známých drah

RAS/MAPK, PI3K/AKT a STAT5 (Abu-Duhier et al., 2001; Hubbard, 2001). FLT3-TKD jsou snadno identifikovatelné mutace, protože vedou ke ztrátě v místě restrikčního enzymu EcoRV v případě, je-li mutován jeden z kodónů pro D835 nebo I836. Následný PCR produkt odvozený od kinázové domény, který není štěpen EcoRV, signalizuje přítomnost této mutace. (Levis a Small, 2003). Štěpení restrikčním enzymem EcoRV je požadováno za standardní metodu, která ovšem má určité nedostatky. Především závislost interpretace výsledků na účinnosti štěpení. Detekovat FLT-TKD mutace lze ale i za pomoci denaturační vysokoúčinné kapalinové chromatografie (DHPLC), která je v porovnání s předchozí metodou citlivější. Pokud jsou mutace přítomny pouze v malé části amplifikovaných alel, je většinou obtížné je detekovat pomocí štěpení restrikčním enzymem, ale DHPLC metoda je v tomto případě spolehlivější. Dalším významným omezením restrikčního štěpení je, že detekuje mutace pouze ve specifické oblasti DNA, obvykle 4 – 6 párů bazí. DHPLC však detekuje mutace v širší oblasti DNA. A v neposlední řadě výsledný chromatograf umožňuje u DHPLC přímou identifikaci mutací ze vzorku bez nutnosti sekvenování (Ali et al., 2017).

### **3.1.3 Inhibitory FLT-3 kinázy, strukturní typy, selektivita, terapeutický potenciál**

Vzhledem k tomu, že AML spadá mezi nejčastější akutní leukémie u dospělých s nejvyšší úmrtností, je samozřejmostí snaha o navržení co nejvhodnější léčby. K volbě správné léčby je třeba mimo jiné cytogenetické klasifikace, jelikož diagnostika karyotypu je jedním z nejvíce nezávislých prognostických ukazatelů AML, která slouží k identifikaci biologicky odlišné podmnožiny onemocnění. Široce je používána ve spojení s informací ohledně heterozygotní mutací genu NPM1, s mutací v transkripčním faktoru CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA) a také s FLT3 mutacemi u pacientů s AML zejména v případech s normálním karyotypem, pro přizpůsobení rizik spojených s léčbou. Určitá omezení nastávají v případech, kdy je třeba zpřesnit stávající cytogenetické klasifikační systémy vzhledem k prognostickému významu abnormalit v karyotypu. Distribuce pacientů je založená především na systémech dle European Leukaemia Net a UK Medical Research Council, rozlišující taktéž pacienty s FAV-příznivým, INT-intermediate (1 a 2) a ADV-nepříznivým karyotypem. Pacientům s příznivým rizikem jsou v současnosti nabízena léčiva rozdělená do kategorií na základě jejich mechanismu účinku a pacientům s nepříznivým rizikem bývá především

doporučována alogenní transplantace kmenových buněk v první remisi (Grimwade et al., 2010; Kadia et al., 2016).

Zde je uveden přehled některých nejslibnějších nových látek pro léčbu AML. Pro lepší přehlednost jsou popsány inhibitory zahrnuté v **Tab. 1**.

*Tab. 1: Stručný přehled popsaných selektivních a neselektivních FLT3 inhibitorů včetně jejich cílů inhibice, podstoupených nebo probíhajících fází klinických studií a pár příkladů pozorovaných nežádoucích účinků (Převzato a upraveno z Fakih et al., 2018).*

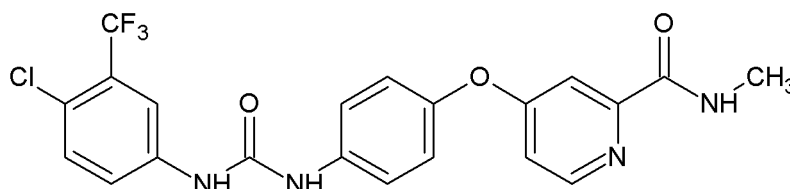
| <b>FLT3 inhibitor</b>         | <b>Selektivita</b> | <b>Cíle inhibitoru</b>           | <b>Fáze klin. studií</b> | <b>Toxicita</b>   |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------|---|
| <b>Sunitinib (SU11248)</b>    | Neselektivní       | c-KIT, PDGFR, FLT3               | II.                      | Nechutenství, bolesti hlavy   |
| <b>Lestaurtinib (CEP701)</b>  | Neselektivní       | VEGFR, FLT3                      | II., III.                | Infekce, infarkt myokardu   |
| <b>Tandutinib (CT53518)</b>   | Neselektivní       | PDGFR, c-KIT, FLT3               | I., II.                  | Svalová slabost   |
| <b>Quizartinib (AC220)</b>    | Neselektivní       | PDGFR, c-KIT, FLT3               | I., II., III.            | Arytmie   |
| <b>Sorafenib</b>              | Neselektivní       | RAF-1, VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT3 | I., II., III.            | Kožní vyrážka, únava, zažívací potíže   |
| <b>Midostaurin (PKC412)</b>   | Selektivní         | FLT3-ITD, FLT3-TKD               | I., II., III.            | Horečka, příznaky podobné chřipce, vředy v ústech, neobvyklé podlitiny a krvácení |
| <b>Gilteritinib (ASP2215)</b> | Selektivní         | FLT/AXL                          | I., II., III.            | Zažívací potíže, únava, hepatotoxicita  |
| <b>Crenolanib (CP-868596)</b> | Selektivní         | PDGFR, FLT3                      | I., II., III.            | Prozatím neznámé  |
| <b>FLX925</b>                 | Selektivní         | CDK4/6, FLT3                     | I.                       | Prozatím neznámé  |

## Sorafenib

Jedná se o multikinázový inhibitor s prokázanou inhibiční aktivitou vůči RAF-1, receptorové kinázy receptorů pro VEGFR, PDGFR, c-KIT a FLT3. Sorafenib byl oficiálně schválen jako první zástupce cílené biologické léčby renálního a hepatocelulárního karcinomu (Wilhelm et al., 2004). Jakožto inhibitor FLT3 vedlo v I. fázi klinického testování jeho podávání 400 mg dvakrát denně u subjektů s AML k významnému snížení blastů v kostní dřeni a periferní krvi. Sorafenib byl také mnohonásobně účinnější v indukci apoptózy v buňkách Ba / F3 s mutacemi FLT3-ITD a D835G než u buněk s FLT3-D835Y (Zhang et al., 2008).

Ve II. fázi klinického testování byla studována molekulární odpověď a relaps u osmnácti pacientů s mutovaným FLT3 léčených kombinací sorafenibu s cytostatiky idarubicinem a cytarabinem. Vybráni byli pacienti ve věkovém rozmezí 18 – 60 let s dříve neléčenou AML, což bylo podmínkou hlavně z důvodu možného výskytu lékové rezistence při předchozí léčbě. Po zavedené léčbě sorafenibu v kombinaci s cytostatiky dosáhli všichni pacienti buď kompletní nebo částečné remise, prakticky u všech přetrvávala trombocytopenie. Většina pacientů ale nakonec později prodělala relaps onemocnění, který původně nebyl předpokládán (Al-Kali et al., 2011).

Do III. fáze klinického testování spadá studie využívající selektivní interní radiační terapie, která vykazuje účinnost u neoperovatelného hepatocelulárního karcinomu v játrech. Tato studie porovnávala bezpečnost a účinnost radiační terapie a sorafenibu u pacientů s lokálně pokročilým hepatocelulárním karcinomem. Celkem bylo randomizováno 360 pacientů, z toho 182 se léčilo radiační terapií a 178 sorafenibem. Studie neprokázala žádné statisticky významné rozdíly, co se týče přežití pacientů a v podstatě tato studie poukazuje na to, že radiační terapie může nabídnout lépe tolerovatelnou alternativu k sorafenibu (Chow et al., 2018).



**Obr. 3: Sorafenib (CEP701)**

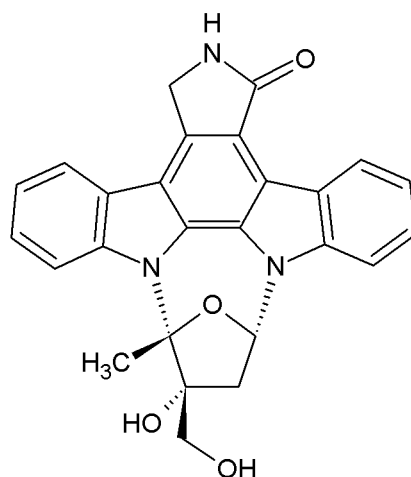
## Lestaurtinib (CEP701)

Preklinické studie charakterizují tuto orálně dostupnou sloučeninu jako inhibitor VEGFR, ale není silným inhibitorem jiných receptorových tyrosinkináz souvisejících s FLT3. CEP701 je cytotoxický pro několik buněčných linií odvozených od lidské leukémie a primárních buněčných linií, pocházejících z kostní dřeně, které nesou FLT3 mutace. U testovaných myších modelů s FLT3-ITD jim podávání CEP701 prodlužovalo celkové přežití a dále byl inhibitor zkoumán z hlediska bezpečnosti a snášenlivosti u pacientů s rakovinou prostaty, lymfomů a nevléčitelných solidních nádorů, přičemž vykazoval podobné farmakokinetické profily jako u zdravých dobrovolníků. Jedna ze studií I. / II. fáze klinického testování sloužila k určení hematologických účinků CEP701 v *in vivo* podmínkách jako záchranná léčba u pacientů s refrakterní, relabující nebo slabě rizikovou AML s mutacemi FLT3. CEP701 byl dobře snášen a nevyskytla se ani při zvýšení dávek žádná významná toxicita vedoucí k ukončení léčby. CEP701 by se tedy mohl podávat jako monoterapie pacientům s refrakterní AML či relapsem onemocnění (Smith et al., 2004).

Studie II. fáze klinického testování, první tohoto typu, zahrnuje především starší neléčené pacienty s AML, u kterých se nepovažovala za vhodnou intenzivní chemoterapie. Podával se jim CEP701 jako monoterapie, přičemž byl dobře tolerován. Běžně pozorovaná toxicita se projevovala nevolností, zvracením, zácpou, průjmem a zvýšením koncentrace alkalické fosfatázy. Přesto CEP701 dosáhl relativně malé klinické účinnosti, ale do budoucna studie doporučuje zavedení kombinované léčby (Knapper et al., 2006).

Rozsáhlá studie spadající do III. fáze klinických studií zahrnuje pacienty s nově diagnostikovanou AML nebo vysoce rizikovým MDS. Randomizace pacientů probíhala několik let, poté pacienti podstoupili indukční chemoterapii, po které byli informováni o stavu mutace FLT3, která se zjistila u všech pacientů. Jednalo se o FLT3-ITD i FLT3-TKD a zahájila se u nich léčba CEP701. Bohužel ani tyto studie nedokázaly žádný významný klinický přínos, pokud jde o míru remisí a přežití pacientů (Knapper et al., 2017).



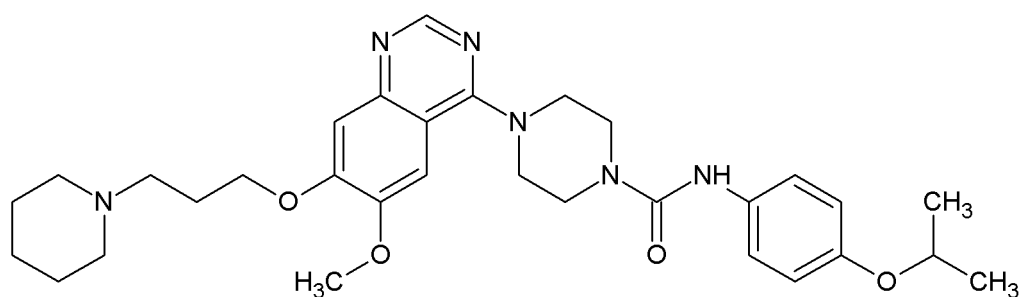


**Obr. 4: Lestaurtinib (CEP701)**

### **Tandutinib (CT53518)**

Další inhibitor, tandutinib, je schopen inhibovat proliferaci hematopoetických kmenových buněk *in vivo*, které mají mutace FLT3-ITD a u buněk s touto mutací indukuje apoptózu. Léčivo bylo vyvinuto speciálně pro léčbu AML s aktivačními mutacemi. Na základě preklinických studií u zvířat se zdá být léčivo vhodné díky vysoké orální dostupnosti, dlouhému plazmatickému poločasu a dobrému profilu bezpečnosti (Kelly et al., 2002).

V I. klinické fázi testování tandutinib vykazoval určitou aktivitu u pacientů s refrakterní nebo relapsovou AML s mutacemi FLT3-ITD. Nicméně byla prokázána toxicita závislá na dávce, která se projevovala reverzibilní svalovou slabostí, nevolností a zvracením. Vykazuje vysokou orální dostupnost a dosahuje srovnatelných koncentrací v mozkové tkáni jako jsou koncentrace plazmatické. Klinické studie I. / II. fáze u pacientů s recidivujícím glioblastomem byla provedena celkem u padesáti šesti pacientů zahrnutých v obou fázích studií. Studie nedosáhly přílišného úspěchu i přes to, že ačkoliv tandutinib dosáhl adekvátních koncentrací k dosažení inhibice PDGFR- $\beta$  v glioblastomu, nebyla účinnost tohoto cíleného inhibitoru dostatečná. Studie sice vedly k negativním výsledkům, ale poskytly cenné informace, pomocí níž lze hodnotit další nová činidla určená k léčbě glioblastomu (Batchelor et al., 2017).



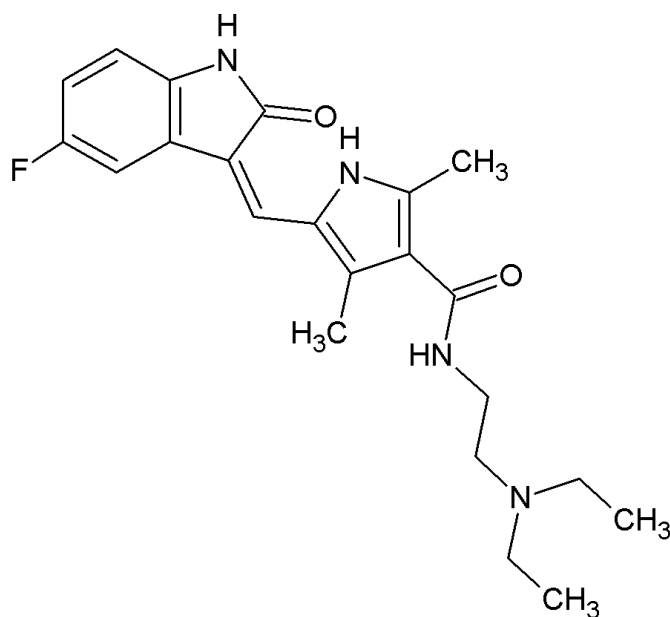
*Obr. 5: Sunitinib*

### **Sunitinib (SU11248)**

Sunitinib je multikinázovým inhibítorům účinným vůči c-KIT, receptoru kinázové inzerční domény a PDGFR. V současné době se využívá především k léčbě karcinomu ledvinových buněk, gastrointestinálních stromálních nádorů a neuroendokrinních nádorů, u kterých léčba jiným inhibítorům tyrosinkinázy selhala. Do studie bylo zahrnuto 312 pacientů randomizovaných do dvou skupin. První užívající sunitinib, druhá placebo. Sunitinib zvýšil oproti placebo dobu progresu nádoru, vedla i přežití bez progresu a celkově míra odpovědi na nádor byla významně vyšší. Daná terapie byla u pacientů přiměřeně tolerována až na nejčastější nežádoucí účinky, jakými byla únava, průjem, změna barvy kůže a nevolnost (Demetri et al., 2006).

U pacientů s FLT3-ITD vedlo podávání sunitinibu v I. fázi klinického testování ke krátkým remisím a významným toxicitám (Fiedler et al., 2005). Ve studiích I. / II. Fáze testování pacienti nad šedesát let s AML a s mutacemi FLT3 užívali sunitinib v kombinaci se standardní indukční a konsolidační chemoterapií a byla u nich zaznamenána kompletní remise. Hlavní zaznamenaná toxicita je hematologického rázu, konkrétně docházelo k neutropenii a trombocytopenii. Předpokládá se, že tento nežádoucí účinek je způsoben přidáním sunitinibu. Dále je nutné zmínit také riziko kardiotoxicity, představující hrozbu zejména pro pacienty užívající současně antracykliny (Fiedler et al., 2015).

Studie ve II. / III. fázi klinického testování přinášejí souhrnné výsledky z hlediska dlouhodobé odpovědi léčiva u pacientů s metastatickým renálním karcinomem. Z velkého počtu pacientů bylo u nemalého procenta pozorováno z dlouhodobějšího hlediska přežití bez další progresu. Dlouhodobá léčba sunitinibem byla spojena s možností snižovat dávky léčiva, zvýšila také dobu přežití a také dokonce bylo pozorováno zmenšení nádoru v porovnání s výchozím stavem na začátku léčby (Tannir et al., 2017).



**Obr. 6: Sunitinib (SU11248)**

### **Quizartinib (AC220)**

Multikinázový inhibitor spadající do druhé generace FLT3 inhibitorů vyvinutých k léčbě AML se vyznačuje vynikající účinností inhibice, selektivity i farmakokinetických vlastností v rámci skupiny těchto inhibitorů. Jedná se o první lék specificky navržený jako inhibitor FLT3 a zároveň má větší účinnost *in vivo* než inhibitory první generace (Pratz et al., 2010). Obsáhlejší studie porovnávala quizartinib s dalšími sloučeninami jako lestaurtinib, tandutinib, midostaurin, jeho hlavní metabolit CGP52421, sorafenib a sunitinib. Co se týče afinity pro FLT3, quizartinib měl druhou nejvyšší hodnotu afinity po inhibitoru sunitinib. Nejvíce však quizartinib inhiboval FLT3 v buněčném prostředí lidské leukemické linie. Dále byl využit KinomeScan panel s 402 kinázovými vazebnými testy, které reprezentují téměř 80 % lidských proteinkináz. Ve výsledku byla identifikována pro AC220 nejvyšší afinita pro FLT3, dále pak také pro další kinázy, jako je KIT a PDGFR, blízké příbuzné receptoru tyrosinkinázy (RTK).

Pro posouzení farmakokinetických vlastností se sledovaly dvacet čtyři hodin plazmatické hladiny u myší, jimž byla podána dávka 10 mg/kg. Sloučenina se dobře absorbovala, maximální hladiny v plasmě 3,8  $\mu\text{M}$  dosáhla již v průběhu dvou hodin po podání a zjevný biologický poločas v plasmě odpovídal přibližně čtyřem hodinám. Maximální koncentrace volného inhibitoru se ukázala více jak třicetkrát vyšší než  $\text{IC}_{50}$  pro inhibici FLT3-ITD v buněčných testech, a navíc po uplynutí 24 hodin byl quizartinib stále

přítomen v koncentraci dostatečné a vhodné pro kontinuální inhibici aktivity FLT3 u myši (Zarrinkar et al., 2009).

V I. fázi studií u nemocných s refrakterní a relabující AML včetně MTD byla stanovena ideální dávka 200 mg/den (Levis, 2014).

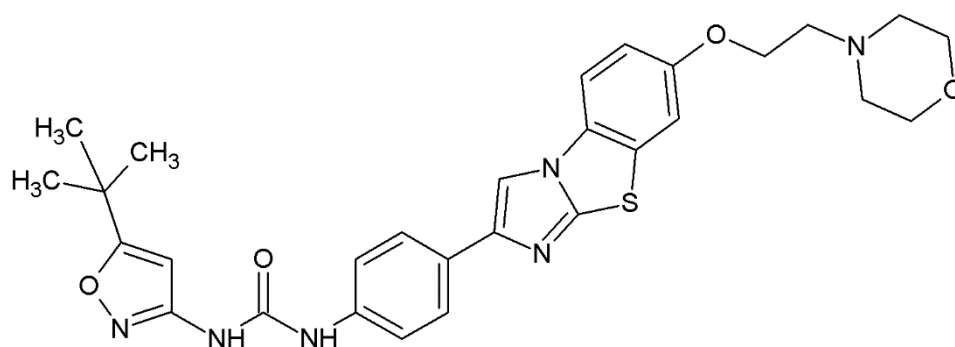
Na základě II. fáze klinického testování, prováděné na skupině pacientů s FLT3/ITD s prodělaným relapsem či refrakcí, byla doporučena dávka 90 mg/den u žen a 135 mg/den u mužů (Cortes et al., 2012). Předběžné výsledky randomizované studie však hlásí nižší dávky quizartinibu a to sice 30 nebo 60 mg. Studie se prováděla za účelem stanovení optimální dávky pro monoterapii FLT3/ITD, záchrannou chemoterapii nebo pro pacienty s relapsem po transplantaci krvetvorných buněk (Cortes et al., 2013).

Díky pokrokům ve výzkumu se celkové přežití dětských pacientů s AML zlepšily více než u dospělých, nicméně vzhledem k tendenci onemocnění se vracet, je pravděpodobnost přežití stále špatná. Především u pacientů s FLT3/ITD, vyskytující se už 15 % pediatrických pacientů a 30 % dospělých, je riziko relapsu onemocnění vysoké. Sorafenib a quizartinib jakožto inhibitory FLT3 tyrosinkinázy zpočátku prokazují klinickou odpověď, tak přesto u většiny pacientů se onemocnění stává rezistentním během několika měsíců až jednoho roku léčby. Proto je zapotřebí hledat vhodnější terapie pro nově diagnostikované rezistentní FLT3/ITD. Nedávné předběžné analýzy se snažily definovat, čím je rezistence způsobena. Došlo se k závěru, že mechanismus rezistence je založen na získávání sekundárních bodových mutací ve FLT3 kinázové doméně, které takto mohou ovlivnit vazbu léčiva s/nebo dojde k autotaktivaci kinázy samotné. Nalezeny byly mutace v kinázové doméně podporující rezistenci vůči léčivu quizartinib a to konkrétně aminokyselinové zbytky v aktivační smyčce (D835, Y842) a následně zbytek F691. Určitou rezistenci, podobnou quizartinibu, taktéž vykazoval i inhibitor sorafenib. Předpokládá se, že zbytky D835 a Y842 stabilizují neaktivní konformaci aktivační smyčky tvorbou vodíkových vazeb s amidovými skupinami řetězce S838 a postranního řetězce D811. Výměna těchto zbytků může tak destabilizovat neaktivní konformaci, čímž se docílí nenavázání léčiva quizartinibu. Data byla sice odvozena z malého počtu pacientů, přesto budou muset být v budoucnu ověřena v rozsáhlejších studiích, protože jak se zdá, substituce v F691 i D835 představují významné překážky při tlumení choroby jak u quizartinibu, tak i sorafenibu (Smith et al., 2012).

Nedostatek znalosti kokrystalické struktury quizartinibu navázaného na FLT3 brání snahám o zlepšení inhibitorů FLT3. Znalost struktury pomáhá především v objasnění mechanismu mutací vedoucích k lékové rezistenci. Inhibitory malých molekul zaujímají mnoho různých konformačních stavů. Zatímco kinázy zaujímají společnou aktivní

konformaci, existují odlišné neaktivní konformace. Důležitým prvkem sloužícím ke klasifikaci inhibitorů kináz je konzervativní motiv Asp-Phe-Gly (DFG). Orientace motivu DFG rozděluje kinázy do dvou reprezentativních skupin. Skupinu, kam spadají inhibitory typu I, charakterizuje aktivní konformace DFG-in, kdy zbytek kyseliny asparagové v motivu DFG, který leží na N-konci aktivační smyčky, je nasměrován k aktivnímu místu pro koordinaci s ATP. Inhibitory typu II jsou definovány konformací DFG-out, ve které není kyselina asparagová vhodně orientována a zároveň se u nich předpokládá vyšší selektivita. Bylo zjištěno, že pro zvýšení účinnosti a selektivity quizartinibu k FLT3 je nutné, aby inhibitor zaujal inaktivní konformaci zvanou Abl-like, typickou i pro jiné kinázy jako c-KIT a VEGFR, a zároveň aktivační smyčka musí být stabilizována v orientaci DFG-out a „přehnuta“ zpět na kinázovou doménu (Zorn et al., 2015).

Vzhledem k příznivým výsledkům postoupil quizartinib již do III. fáze klinického testování. Cílem studií je zjistit, zda monoterapie quizartinibem prodlužuje celkové přežití u pacientů s FLT3-ITD nereagující na léčbu nebo takoví, kteří prodělali relaps během 6 měsíců po první zavedené léčbě AML a zároveň byli starší osmnácti let. Testování v současné době probíhá a předpokládá se jeho ukončení či první výsledky v září 2018 (ClinicalTrials, 2014), stejně jako další studie probíhající pod stejnou společností. Cílem je porovnání účinku quizartinibu s placebem, podávaným se standartní indukční a konsolidační chemoterapií a poté podávaný jako udržovací léčba u pacientů s FLT-ITD. Ukončení studie se předpokládá až v roce 2020 (ClinicalTrials, 2016).



**Obr. 7: Quizartinib (AC220)**

## Midostaurin (PKC412)

Midostaurin (Obr), objevený v roce 1986, jakožto inhibitor proti protein kináze C. I. fáze studií midostaurinu, podávaném pacientů se solidními nádory, prokázala tolerovatelnou dávku léčiva, která vedla k inhibici enzymu v *in vivo* podmínkách. Pro tuto studii bylo využito třiceti dvou pacientů s pokročilými solidními nádory, kterým bylo podáváno sedm různých dávek léčiva v rozmezí 12,5 až 300 mg denně po dobu 68 cyklů. Výsledky vedly k závěru, že PKC412 může být nadále bezpečně podáván orální cestou a je vhodný pro II. fázi následných klinických studií (Propper et al., 2001).

V následující významnější studii bylo léčivo testováno v II. fázi klinického testování u pacientů s prokázanou relabující či refrakterní AML nebo pokročilou diagnózou myelodysplastického syndromu (MDS). V případě AML byly u daných pacientů požadavkem pro vstup do testování ITD nebo D835Y aktivující mutace. Hlavním cílem studie bylo zhodnotit antileukemickou aktivitu PKC412 v dávce 75 mg podávané orálně třikrát denně a posoudit tak farmakokinetiku léčiva a změřit inhibici FLT3 kinázy v buňkách získaných od léčených pacientů. FLT3 mutace byla potvrzena u všech pacientů. V 18 případech z 20 se jednalo o ITD mutace mezi 18 a 189 párem bází, u zbývajících dvou pacientů byla zdokumentována D835Y mutace. Celkově bylo léčivo dobře snášeno, vyskytovala se především pouze nevolnost. U mnohých pacientů došlo k výraznému poklesu periferních blastů (až o 50 %) a zároveň u nich se současně snížil počet neutrofilů. Přestože později došlo opět k navýšení neutrofilů, hodnoty blastů zůstaly nadále nízké. Bohužel u těchto pacientů bylo obtížné určit, zda myelosuprese souvisela přímo s podávaným lékem nebo nemocí. U třech pacientů došlo k fatální plicní události, u nichž jedna byla v souvislosti s postupnou leukocytózou a téměř jistě nesouvisela s podávaným lékem.

Pro studium farmakokinetiky byly k dispozici údaje o plazmatické koncentraci od patnácti z dvaceti pacientů. Koncentrace PKC412 vzrostla během prvních dvou až tří dnů od zahájení léčby a vrcholila mezi třetím až sedmým dnem. Při následném pokračování orálního podávání látky se koncentrace PKC412 časem snížila přibližně o 70 % a to z hodnoty 5,39  $\mu\text{g/mL}$  naměřené třetí den až na 1,34  $\mu\text{g/mL}$  odpovídající rovnovážnému stavu. Podobný koncentrační profil vykazoval i aktivní metabolit CGP62221 (Obr. 9), kde jeho koncentrace dosáhla vrcholu osmý den a snížila se zhruba o 63 %. Nicméně koncentrace druhého metabolitu CGP52421 se zvyšovala až do dvacátého osmého dne a během léčby zůstávala relativně stabilní. Vzhledem k tomu,

že z farmakodynamického hlediska midostaurin inhibuje několik různých kináz, bylo obzvlášť důležité prokázat inhibici FLT3 tyrosinkinázy *in vivo*, konkrétně inhibici autofosforylace. Vzorky celkem pěti pacientů vykazovaly hodnotitelný pokles signálu, tudíž pozitivně reagovali na PKC412 (Stone et al., 2005).

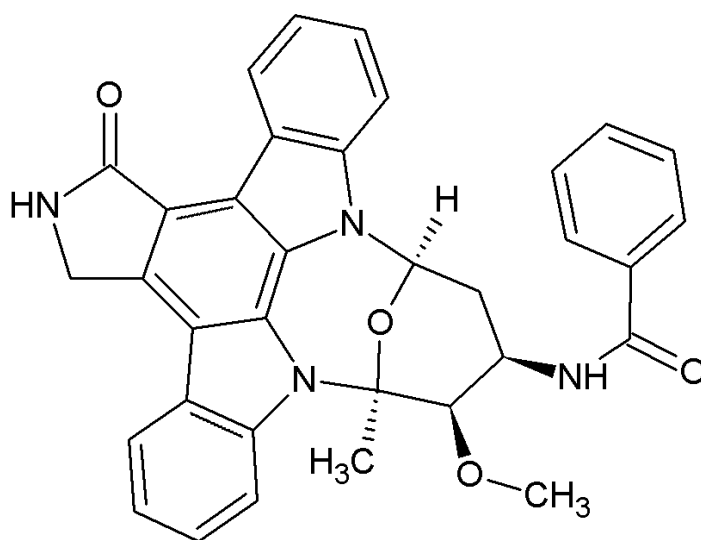
Další studie prováděná na celkem devadesáti pěti pacientech, spadajících taktéž do II. fáze klinického testování, potvrdila účinnost midostaurinu. Léčivo bylo podáváno orálně v množství 50 nebo 100 mg denně. 71 % pacientů s FLT3 mutací a 42 % pacientů s FLT3-WT dosáhlo významného snížení cirkulujících blastů v kostní dřeni (více jak 50 %). Co se týče toxicity, tak nebyl pozorován patrný rozdíl mezi skupinami pacientů, kteří dostávali dávku buď 50 nebo 100 mg (Fischer et al., 2010).

Snaha byla také to identifikaci dalších cílů midostaurinu a ukázalo se, že je schopen inhibovat autofosforylaci FLT3-WT stimulovaného FL v myších buňkách Ba / F3 závislých na IL-3 a také bylo dokázáno, že inhibuje aktivitu mutovaného FLT3. Bylo pozorováno, že midostaurin indukuje programovanou buněčnou smrt u Ba / F3 buněk transdukovaných lidským FLT3-ITD onkogenem a to tak, že inhibitor přímo potlačuje aktivitu FLT3 kinázy. Každopádně proliferace buněk je inhibována midostaurinem jak u buněk Ba / F3-ITD, tak Ba / F3-D835Y a to s hodnotou IC<sub>50</sub> menší než 10 nM. Midostaurin indukoval zastavení buněčného cyklu Ba / F3-ITD za méně než dvacet čtyři hodin a apoptózu během dvaceti čtyř až čtyřiceti osmi hodin. Celkové výsledky studie poukazují na to, že midostaurin je potenciálně účinným inhibitorem, a to hlavně vzhledem k tomu, že i přestože FLT3 je často mutován, tak midostaurin je schopen oba typy známých mutovaných FLT-kináz inhibovat již v nanomolárních koncentracích. Tyto významné výsledky naznačují, že aktivita inhibitoru pozorována v *in vitro* podmínkách by mohla být úspěšná i *in vivo* (Weisberg et al., 2002).

Později byly provedeny studie, kde midostaurin prokázal svou schopnost inhibovat aktivitu FLT3 v lidských buněčných liniích pozitivních na FLT3-ITD. Vybráni byli pacienti nad 60 let s nově diagnostikovanou AML a pacienti nad 18 let s prodělaným relapsem nebo rezistencí vůči léčbě. Podávala se jim maximální tolerovaná dávka či doporučená dávka midostaurinu v kombinaci s intravenózní aplikací protinádorového léku desitabinu. Výsledky studie naznačují, že desitabin společně s midostaurinem může být podáván většině pacientů, jelikož jsou společně dobře tolerovány. Přestože nedošlo k žádnému úmrtí pacientů, zůstává důležitým poznatkem to, že u dvou pacientů došlo k výskytu plicní toxicity a u jednoho se projevila okultní infekce. Závažná plicní toxicita byla už u dřívějších studií hlášena při podávání midostaurinu ve fixní dávce 75 mg třikrát denně, což je pravděpodobně způsobeno inhibicí receptoru vaskulárního endotelového

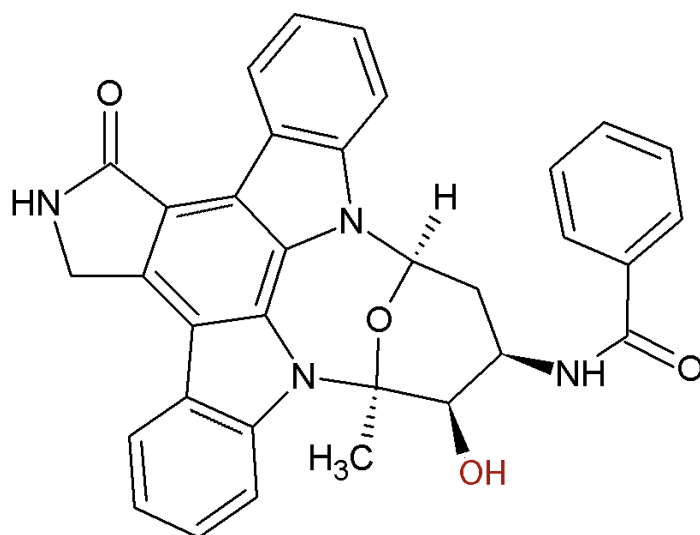
růstového faktoru tímto inhibítorem. Farmakokinetické výsledky analýzy nasvědčují tomu, že kombinace midostaurinu a desitabinu mohou být bezpečně podávány bez významných změn metabolismu midostaurinu (Williams et al., 2013).

Na základě relativně pozitivních výsledků několika studií midostaurin postoupil do III. fáze testování se zaměřením na pacienty mladší šedesáti let s AML s mutacemi FLT3. Zahrnuto bylo celkem 3277 pacientů, kterým se podával midostaurin nebo placebo, obojí se standardní indukční chemoterapií. Ještě před podáváním léčby byla provedena randomizace pacientů, a to dle podtypu mutace FLT3. K rozdělení došlo na pacienty s FLT3-ITD a vysokým či nízkým poměrem mutantních alel a skupinu s FLT3-TKD mutacemi. Randomizováno bylo 717 pacientů a celkové přežití pacientů se zvýšilo při kombinaci s midostaurinem (Stone et al., 2017). Účinnost midostaurinu v kombinaci se standardní chemoterapií u pacientů s AML s mutací FLT3 vedla k případnému schválení přípravku ze strany úřadu pro zdraví Health Authority a je veden pod označením Rydapt® (Kaufman, 2017; Kim, 2017).



*Obr. 8: Midostaurin (PKC412)*





*Obr. 9: Metabolit Midostaurinu (CGP62221)*

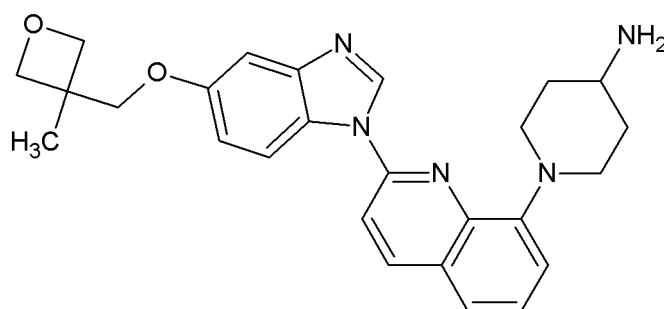
### **Crenolanib (CP-868596)**

Inhibitor FLT3, jež byl vyvinut především jako silný selektivní inhibitor PDGFR $\alpha$  a PDGFR $\beta$ . Preklinické i klinické studie ukázaly crenolanib aktivní u gastrointestinálního stromálního nádoru rezistentního na imatinib, kde rezistence vznikla v souvislosti s mutací v PDGFR $\alpha$ . Později studie prokázaly na základě komerčně dostupného testu kinázové selektivity také jeho účinnost jako inhibitor FLT3. Porovnávána byla inhibiční aktivita FLT3 crenolanibu se sorafenibem a quizartinibem za použití buněčných linií exprimujících FLT3-ITD mutaci a FLT3-WT. Inhibitor prokázal dobrou inhibici autofosforylace u FLT3-ITD a FLT3-WT. Také vykazoval cytotoxický účinek proti buňkám na stejném stupni jako sorafenib, ale ve srovnání s quizartinibem poněkud méně (Galanis et al., 2014).

Zajímavé vlastnosti crenolanibu zahrnují především to, že inhibičním cílem quizartinibu, sorafenibu a ponatinibu je mimo jiné i c-KIT, což může být méně žádaným účinkem inhibitorů. Ovšem crenolanib inhibuje FLT3 mutanty, ale z velké části na jeho inhibici c-KIT nereaguje. Dokazuje to stonásobný posun v životaschopnosti buněk v biochemických testech. Kromě toho crenolanib vykazuje omezenou aktivitu vůči dalším kinázám a může být takto spojen s nižší toxicitou než ostatní dostupné inhibitory. Dále si uchovává inhibiční aktivitu proti FLT3-D835 mutacím v malých koncentracích. Jakožto silný a selektivní inhibitor představuje velmi nadějnou látku. (Smith et al., 2014).

Protinádorová účinnost u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem s mutací D842V se potvrdila i během II. fáze klinického testování a momentálně probíhá

III. fáze s crenolanibem v porovnání s placebem. *In silico* modelování dané studie potvrdilo hypotézu, že crenolanib váže aktivní zbytky bez zapojení sousedního alosterického místa, které je k dispozici pouze v neaktivní konformaci, která je vhodná pro inhibitory typu II jako je imatinib a sunitinib. Crenolanib se zaměřuje tedy na aktivní konformaci tyrosinkinázové podjednotky PDGFR, ve které je aktivační smyčka fosforylována. U pacientů nesoucích mutaci D842V by proto měli být navrženi pro léčbu inhibitorem tyrosinkinázy typu I, který se zaměřuje na vazebné místo ATP, je-li kináza v aktivní konformaci (Indio et al., 2018).



**Obr. 10: Crenolanib (CP-868596)**

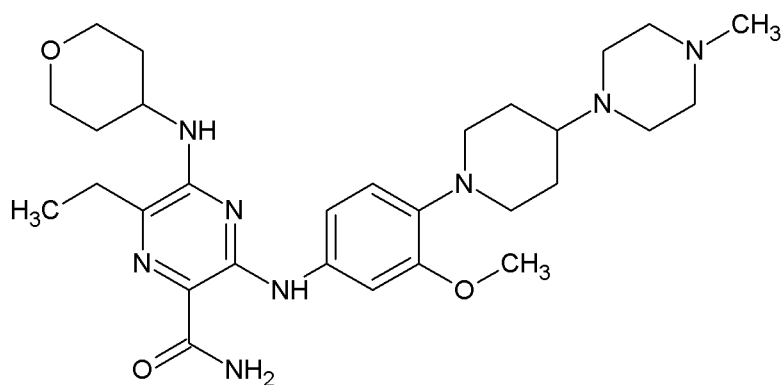
### **Gilteritinib (ASP2215)**

ASP2215 inhibuje funkci FLT3 a AXL, molekul zapojených do růstu rakovinných buněk. Prokázal inhibiční aktivitu vůči FLT3-ITD a FLT3-TKD, což jsou běžné mutace FLT3, které se objevují u pacientů až v 30 % AML. Také inhibuje AXL receptor, který je známý pro svůj rezistentní mechanismus v chemoterapii u různých pevných a hematologických malignit. Momentálně na základě vyhodnocení v klinické praxi je ASP2215 zaveden pro léčbu relabující či refrakterní AML s mutací v FLT3.

Uveden je konkrétní případ dvaceti tříletého muže s diagnózou AML s FLT3-ITD, kterou odhalila mutační analýza. Pacient obdržel standardní indukční chemoterapii s cytarabinem a daunorubidem. Indukční terapie byla zkomplikována nekrózou neurčité etiologie vyžadující chirurgický zásah. Po čtyřech týdnech biopsie kostní dřeně prokázala přetrvávající onemocnění s 10 % blastů v kostní dřeni. Byla proto zavedena záchranná terapie s 5-azacitidinem a sorafenibem. U pacienta došlo k relapsu. Následně byla zahájena léčba sorafenibem s novým FLT3 inhibitorem ASP2215. V průběhu pátého cyklu léčby tímto inhibitorem přinesly výsledky biopsie kostní dřeně pozitivní snížení blastů na 5 % (Kasi et al., 2016).

Pro své pozitivní účinky podstoupil ASP2215 další studie, ve kterých byla především zkoumána jeho aktivita a také srovnávána s ostatními známými inhibitory v klinickém vývoji jako je midostaurin, sorafenib, quizartinib nebo crenolanib. Testovala se inhibiční aktivita gilteritinibu proti různým formám FLT3 v buňkách leukémie. Použitím panelu bodových mutací FLT3, o kterých je známo, že poskytují rezistenci vůči inhibitorům jako sorafenib a quizartinib, bylo zjištěno, že gilteritinib vykazuje podobné stupně inhibiční aktivity proti mutacím TKD. Jednou z překážek ve vývoji inhibitorů FLT3 je neschopnost dosáhnout trvalé inhibice FLT3 *in vivo*. Proto se využilo testu inhibice aktivity plazmy právě pro potvrzení trvalé inhibice *in vivo* s plazmou odebranou od pacientů. Výsledky ukázaly, že plazma od tří pacientů užívajících denní dávku 120 mg gilteritinibu zcela inhibovala fosforylaci receptoru FLT3-ITD v buňkách Molm14.

Je známo, že midostaurin, quizartinib a v menší míře crenolaniv inhibují c-KIT, který je nezbytný pro normální hematopoézu. Jelikož je quizartinib z těchto zmíněných inhibitorů neúčinnější, srovnával se gilteritinib s ním v c-KIT imunoblotových testech, ovšem gilteritinib nedosáhl nikterak vyšších hodnot IC<sub>50</sub>. Přesto gilteritinib překonává většinu překážek, které limitují ostatní inhibitory. Jeho účinnost je povětšinou stejná jako u další FLT3 inhibitorů, inhibuje FLT3-TKD mutace odpovědné převážně za rezistenci, je nepravděpodobné, že bude gilteritinib myelosupresivní a předpokládá se, že by mohl dosáhnout trvalé inhibice FLT3 *in vivo*. Vše naznačuje tomu, že by mohl být v budoucnu nejvíce použitelným dosud vyvinutým FLT3 inhibitorem (Lee et al., 2017).



**Obr. 11: Gilteritinib (ASP2215)**

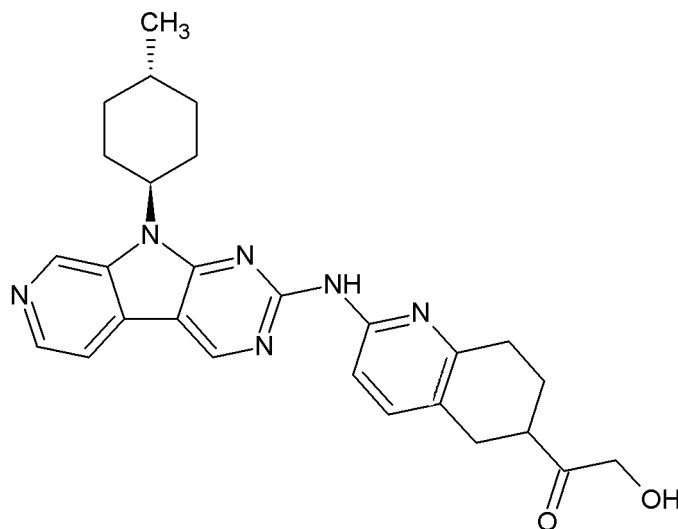
## FLX925

FLX925 byl vybrán pro nejnovější klinické studie z důvodu vyskytujících se získaných sekundárních mutací FLT3 způsobujících omezení až rezistenci terapeutických účinků FLT3 inhibitorů, přičemž FLX925 je navržen tak, aby se těmto mechanismům rezistence vyhnul. Jedná se o orálně dostupný inhibitor FLT3 a cyklin dependentní kinázy 4 (CDK4) a 6 (CDK6) s potenciální protinádorovou účinností. Po podání tohoto FLT3/CDK4/6 inhibitoru byla pozorována specifická vazba a inhibice FLT3 kinázy a tím docházelo k snížené proliferaci u nádorových buněk, které nadměrně exprimují FLT3. Kromě toho inhibuje CDK4 a CDK6 omezením možnosti fosforylace retinoblastomového proteinu (Rb) v časně fázi G1 buněčného cyklu.

Pro prokázání vynikajícího profilu inhibitoru se prováděly studie porovnávající FLX925 s FLT3 inhibitory jako je quizartinib (AC220) a gilteritinib (ASP2215). Hodnoceno to bylo ve více experimentálních systémech. Například vytvořením izigenních buněk Ba / F3, které se navrhly tak, aby exprimovaly FLT3-ITD s různými známými sekundárními mutacemi. Ve srovnání s gilteritinibem měl FLX925 příznivější profil účinků proti řadě vzniklých rezistencí u FLT3-ITD. Co se týče míry rezistence u myších a lidských buněk, tak velikost rezistence na quizartinib a gilteritinib výrazně převyšuje míru pozorované rezistence na FLX925. Předpokládá se, že značná inhibiční aktivita vůči CDK4/6, která je jedinečná pro tento inhibitor, přispívá k jeho vynikajícímu profilu rezistence. (Marubayashi et al., 2016).

V současné době se FLX925 nachází v první fázi klinického testování u lidí. Testuje se jak eskalace dávky, bezpečnost, farmakodynamika, farmakokinetika a protinádorová aktivita u pacientů s relabující a refrakterní AML. Pro klinickou studii byli vybráni pacienti starší ve věku  $\geq 18$  let, u kterých je histologicky potvrzena AML a selhala u nich předchozí indukční terapie nebo u nich došlo k relapsu po předchozí léčbě. Pacienti jsou rozděleni do tří skupin. První skupina pacientů s FLT3 mutací (ITD nebo D835) a s předchozí léčbou FLT3 inhibitorem. Druhá skupina zahrnuje pacienty s FLT3 mutací (ITD nebo D835) ale bez jakékoliv léčby FLT3 inhibitorem a poslední skupinou jsou pacienti bez zjištěné FLT3 mutace v době zápisu do studie. Mimo jiné je třeba pro studii důležité, aby pacienti splňovali přísná kritéria, mezi které spadá například absence klinicky významných kardiovaskulárních onemocnění, aktivní gastrointestinální choroby, které by mohly narušit absorpci podávaného léku, dále také vylučují ze studií pacienty s probíhajícími systémovými infekcemi, hepatitidou B či těhotné nebo kojící ženy.

Vzhledem k tomu, že se jedná o probíhající studii, nejsou prozatím k dispozici žádná vyhodnocení (ClinicalTrials.gov, 2015).

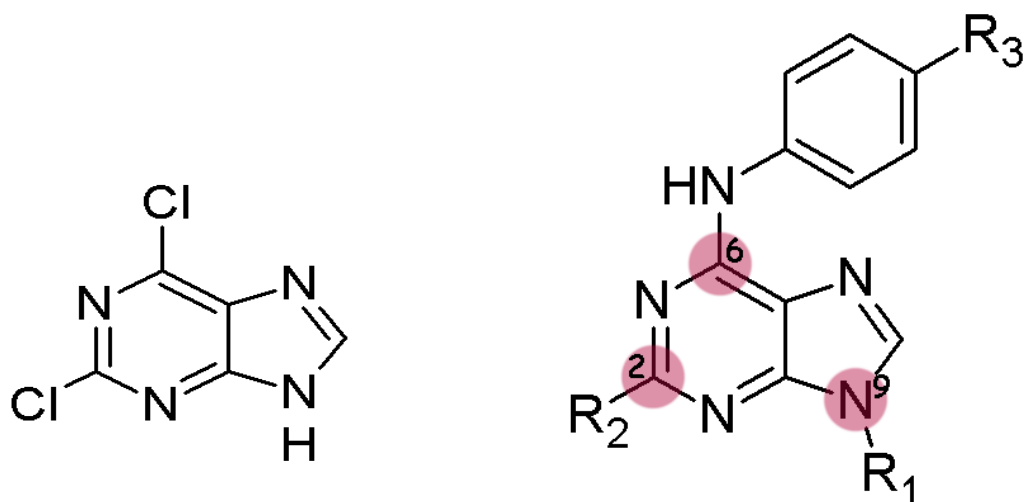


*Obr. 12: FLX925*

Zmíněné inhibitory jsou rozděleny do dvou kategorií, na základě jejich účinnosti a specifity pro FLT3. Inhibitory typu I (sunitinib, lestaurtinib, midostaurin, gilteritinib, crenolanib) se váží k doméně poblíž aktivační smyčky. Inhibitory typu II (sorafenib, quizartinib) se zaměřují na oblast přímo sousedící s ATP-vazebnou doménou receptoru v jeho neaktivní konformaci. Inhibitory I typu jsou většinou obecně účinné proti FLT3-ITD i FLT3-TKD, zatímco inhibitory typu II mají specifickou účinnost vůči FLT3-ITD, ale nejsou účinné proti FLT3-TKD. Především TKD-D835 mutace se ukázaly být hlavním důvodem rezistence u pacientů vůči inhibitorům typu II. Ale i u pacientů FLT3-ITD jsou pochopitelně zaznamenány snížené anebo žádné odpovědi na léčbu. Rezistence vůči FLT3 inhibitorům může být klasifikována jako rezistence před léčbou či objevující se během nebo po léčbě daným inhibitorem.

Snahou nejnovějších studií je tedy porozumět základním mechanismům rezistence a vytvoření lepších přístupů k léčbě (Assi a Ravalđi, 2017). Byla proto vyvinuta celá řada nových 2,6,9-trisubstituovaných purinových derivátů s účinnou inhibiční FLT3 aktivitou, obsahující ve své struktuře mimojiné heterospirocyclická jádra (Gucký et al., 2018).

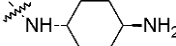
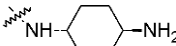
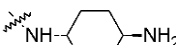
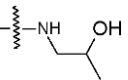
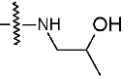
Pro syntézu byl použit komerčně dostupný 2,6-dichlorpurin, v jehož poloze C<sup>6</sup> se provedly nukleofilní substituce zvolenými 4-substituovanými anilinovými nebo 2-substituovanými-5-aminopyridinovými deriváty. Na **Obr. 13** lze vidět zmiňovaný purinový skelet.



**Obr. 13:** 2,6-dichlor purin (nalevo) a purinový skelet s již naznačenými polohami provedených substitucí - C<sup>2</sup>, C<sup>6</sup> a N<sup>9</sup> (napravo) (převzato a upraveno z Gucký et al., 2018).

Do polohy C<sup>2</sup> se substituoval trans-1,4-diaminocyklohexan nebo 2-aminopropan-1-ol. Zatímco do polohy N<sup>9</sup> se substituoval isopropyl, cyklopentyl či benzyl aj. Výsledné látky se podrobily *in vitro* testům, ve kterých se studovala jejich schopnost inhibovat FLT3-ITD a následně se vyhodnotila jejich antiproliferační aktivita v buněčných liniích myeloidní leukémie. Jako buněčné linie se zvolily MV4-11 (odvozené od AML) a K-562 (odvozené od CML). Vysokou selektivitou vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám vykazovaly sloučeniny se substituovaným cyklopentylem na N<sup>9</sup> a trans-1,4-diaminocyklohexanem na C<sup>2</sup>. Pro lepší přehlednost a porovnání biologické aktivity uvádím tabulku se zlomkem připravených derivátů.

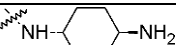

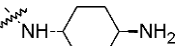

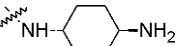
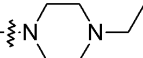
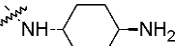
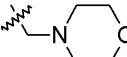
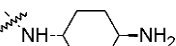

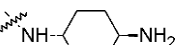
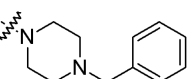
**Tab. 2: Vybrané nově syntetizované 2,6,9-trisubstituované purinové deriváty a srovnání jejich biologické aktivity.**

|   | Substituenty |   |    | IC <sub>50</sub> (μM) GI <sub>50</sub> (μM) |        |        |
|---|--------------|---|----|---|--------|--------|
|   | R1           | R2  | R3 | FLT3-ITD                                    | MV4-11 | K562   |
| 1 | cyklopentyl  |  | Br | 0,004                                       | 0,010  | 0,670  |
| 2 | cyklopentyl  |  | Cl | 0,005                                       | 0,021  | 0,840  |
| 3 | isopropyl    |  | Br | 0,010                                       | 0,0007 | 1,173  |
| 4 | cyklopentyl  |  | Cl | 1,723                                       | 0,235  | 10,910 |
| 5 | benzyl       |  | Br | 9,848                                       | >4     | 9,447  |

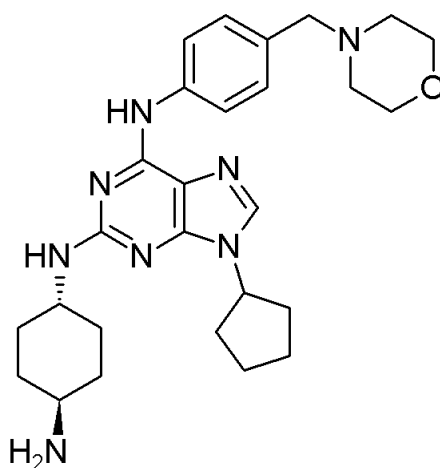
Do tabulky byly vybrány deriváty s vysokou selektivitou vůči FLT3-ITD (látky 1 a 2), ale také naopak i s velmi nízkou selektivitou (látky 4 a 5) pro porovnání vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou. I z tohoto malého množství zahrnutých derivátů je patrné, že 4-aminocyklohexylamino a 4-halogenfenylaminové skupiny v polohách C<sup>2</sup> a C<sup>6</sup> spolu s cyklopentylovou skupinou v poloze N<sup>9</sup> budou patrně mít vliv na inhibici FLT3-ITD buněčných linií (převzato a upraveno z Gucký et al., 2008).

Dále se studoval vliv prodloužených substituentů v poloze C<sup>6</sup> zahrnujících heterospirocyclická jádra (Tab. 3). Zde do tabulky jsou již zahrnuty veškeré připravené látky.

**Tab. 3: Deriváty se substituovanými heterospirocyclickými jádry a jejich srovnání biologické aktivity (převzato a upraveno z Gucký et al., 2018).**

|   | Substituenty |   |   | IC <sub>50</sub> (μM) GI <sub>50</sub> (μM) |        |       |
|---|--------------|---|---|---|--------|-------|
|   | R1           | R2  | R3  | FLT3-ITD                                    | MV4-11 | K562  |
| 1 | cyklopentyl  |  |  | 0,003                                       | 0,018  | 0,940 |
| 2 | cyklopentyl  |  |  | 0,002                                       | 0,002  | 0,965 |
| 3 | cyklopentyl  |  |  | 0,003                                       | 0,001  | 2,070 |
| 4 | cyklopentyl  |  |  | 0,003                                       | 0,002  | 0,380 |
| 5 | cyklopentyl  |  |  | 0,004                                       | 0,003  | 1,220 |
| 6 | cyklopentyl  |  |  | 0,006                                       | 0,017  | 0,700 |

Nejaktivnější sloučenina **4** (**Obr. 14**) byla porovnávána s analogy nesoucí různé modifikace v poloze C<sup>2</sup> pro ověření, zda 4-aminocyklohexylaminová skupina je ideální vzhledem k *in vitro* biologické aktivitě. Zkoumány byly například aminoalkylaminy, hydroxyalkylaminy, aromatické substituenty a další. Přestože ve srovnání s prozatím nejslibnějším derivátem **4** vykazovaly některé o něco vyšší aktivitů vůči FLT3-odrazilo se to na druhou stranu v hodnotách GI<sub>50</sub> u buněčných linií. Přesto byla vybrána řada látek a podrobena dalším biologickým testováním pro sledování buněčné selektivity na rakovinných buněčných liniích s odlišným histologickým původem. Tímto se potvrdila selektivita látek vůči FLT3-ITD, jelikož vykazovaly u linií MOLM-13 nanomolární aktivitu, zatímco u jiných rakovinných linií se jejich aktivita pohybovala v rozmezí mikromolárním. Důležitým poznatkem zůstává fakt, že netransformované lidské buňky nebyly těmito látkami ovlivněny ani při vysokých koncentracích. Celá tato řada látek se stala tedy vhodnými kandidáty pro vývoj silných a specifických FLT3 inhibitorů (Gucký et al., 2018).

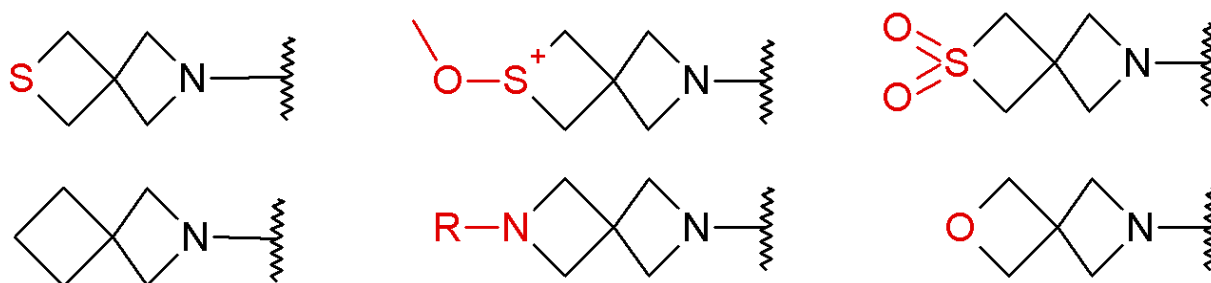


**Obr. 14:** 2,6,9-trisubstituovaný purinový inhibitor *N*<sup>2</sup>-(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-*N*<sup>6</sup>-(4-morfolin-4-ylmethyl-fenyl)-9*H*-purin-2,6-diamin



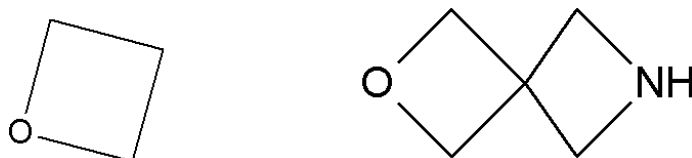
### 3.2 Syntetické přístupy k vybraným heterospirocyclickým jádrům

Synteticky dobře dostupné, heteroatom obsahující, deriváty spiro[3.3]heptanu (**Obr. 15**) obecně vykazují vyšší rozpustnost ve vodě než jejich cyklohexanové analogy a mimo jiné vykazují zvýšenou metabolickou stabilitu. Taková heterospirocyclická jádra mohou být zakomponována do složitějších struktur, například v kombinaci s fluorochinolony za účelem získání účinných sloučenin s podobnou nebo dokonce výrazně zlepšenou metabolickou stabilitou. Heterocyclické deriváty spiro[3.3]heptanu se v poslední době jeví jako nadějně náhrady za piperaziny, piperidiny, morfoliny a thiomorfoliny (Burkhard et al., 2010).



**Obr. 15:** Spiro[3.3]heptany se substituovaným heteroatomem: výběr možných heterospirocyclických jader s potencionálně vhodnými vlastnostmi pro vývoj nových léčiv (Převzato z Burkhard et al., 2010).

Čtyřčlenné heterocykly poskytují příležitost ke změně fyzikálně-chemických a biochemických vlastností analogické sloučeniny. Při vzrůstajícím zájmu o sloučeniny, které jsou nejen méně lipofilní, dobře se začleňují do biologicky aktivních látek a také se snadno syntetizují, padla pozornost na čtyřčlenné heterocykly, konkrétně na oxetany a v této souvislosti za zmínku určitě stojí heterospirocyclické jádro 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (**Obr. 16**) (Wuitschik et al., 2006).

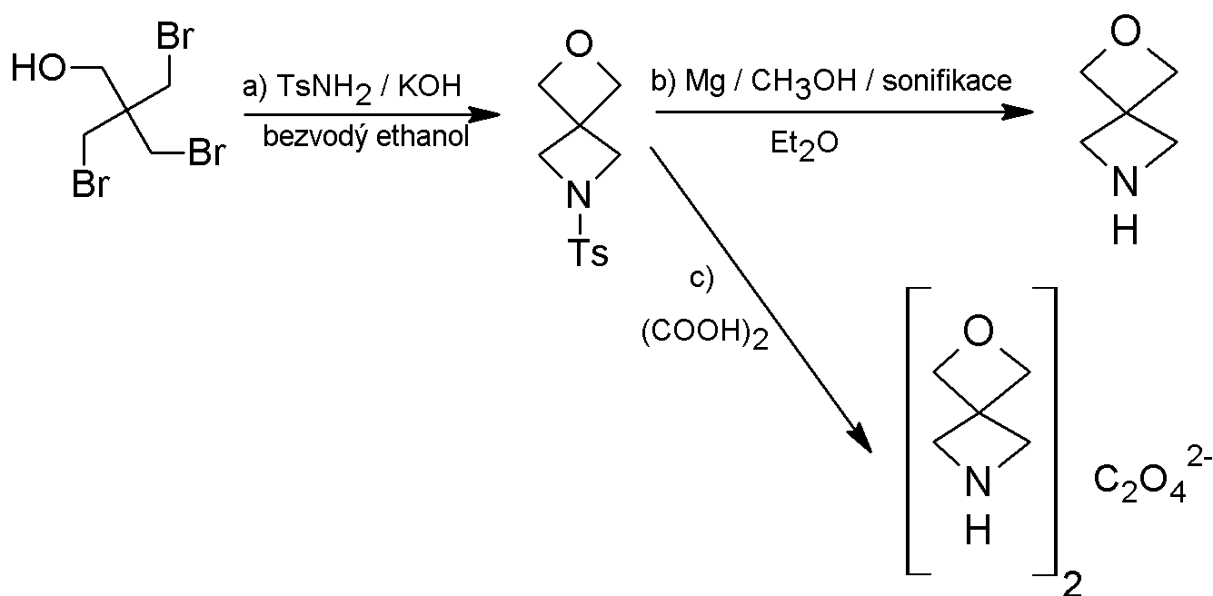


**Obr. 16:** Struktury: Nalevo struktura oxetanu a napravo 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan

2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan se získá vhodným způsobem získá refluxem s 3-brom-2,2-bis(brommethyl)-1-propanolem a *p*-toluensulfoamidem v bezvodém ethanolu

a hydroxidem draselným při reakční době 72 hodin. Chránící skupina tosylu se odstraní pomocí sonifikace práškovým hořčíkem. Příslušnou oxalátovou sůl je možné vytvořit přidáním kyseliny šťavelové, čímž se získá 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (**Obr. 17**). Toto heterospirocyclické jádro bylo připraveno **a)** přidáním 3-brom-2,2-bis(bromomethyl)-1-propanolu k roztoku hydroxidu draselného a *p*-toluensulfoamidu v bezvodém ethanolu, kdy reakční směs je zahřívána k refluxu po dobu 90 hodin. Rospouštědlo bylo odstraněno vakuovým zahuštěním, přidal se následně 1M hydroxid draselná a bílá suspenze se nechala míchat další 2 hodiny při laboratorní teplotě. Směs se zfiltrovala a bílá krystalická látka se promývala destilovanou vodou do vymizení zbarvení a látka (*N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan) se poté vysuší.

Produkt předchozího kroku se rozpustil v methanolu a byl sonifikován s práškovým hořčíkem po dobu 1 hodiny. Surová směs se vakuově zahustí a následně se míchá v diethyletheru po přidání dekahydrátu síranu sodného po dobu 1 hodiny. Poté byla zfiltrována, filtrát se vysušil síranem sodným bezvodým a následovala filtrace. Nyní se naskytují dvě možnosti. Pokud není potřeba 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan uchovávat, ale je určen k dalším syntézám, tak se **b)** filtrát vakuově zahustí do podoby olejovité kapaliny, která se popřípadě dá krátkodobě uchovat při -20 °C. Naskytá se ale možnost dlouhodobého uchování přípravou oxalátové soli, kdy se k **c)** filtrátu za současného míchání přidal roztok bezvodé kyseliny šťavelové v ethanolu, přičemž se okamžitě vytvořila bílá sraženina. Pevná látka se zfiltrovala a vakuově vysušila, čím se získá čistá 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan oxalátová sůl v podobě amorfního bílého prášku (Chen at al., 2014).



**Obr. 17: Schéma možné přípravy 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu I :** a)  $TsNH_2$ , KOH, 76 %; b) Mg, MeOH, sonifikace poté Et<sub>2</sub>O, c) kyselina šťavelová za vzniku stabilní oxalátové soli, 73 %  
Vysvětlivky:  $TsNH_2$  = *p*-toluensulfoamid, Ts = *p*-toluensulfonyl, (převzato a upraveno z Chen et al., 2014).

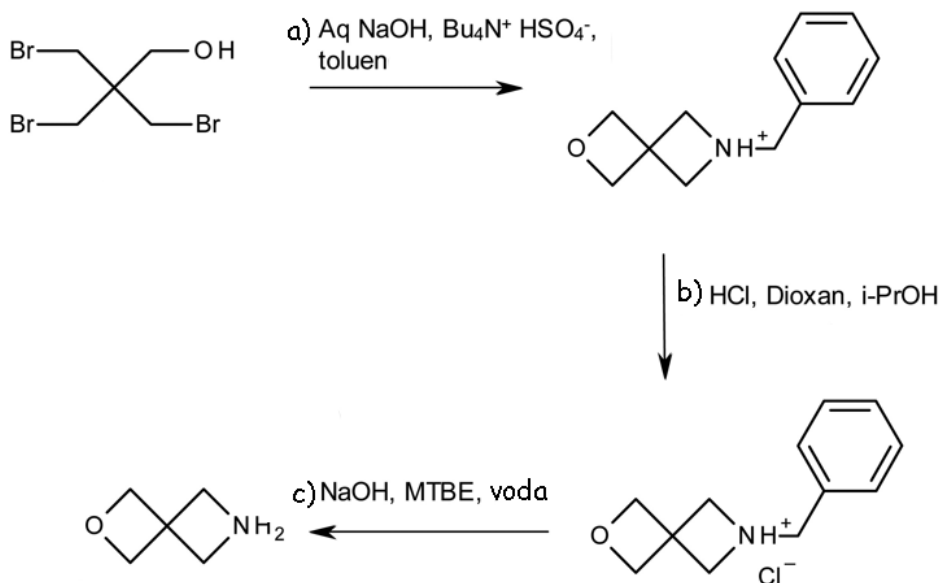
Zmíněný přístup k syntéze 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu je vhodný pro přípravu v malém měřítku, jelikož konkrétně v kroku, kdy je třeba zfiltrvat hořčnaté soli, dochází k velkým ztrátám materiálu a tím pádem nízkým výtěžkům. Byl proveden přechod na benzylovou chránicí skupinu, která nabídla účinnější deprotekcii a následné zpracování sloučeniny. Tento postup se osvědčil i ve větším měřítku, kdy 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan je uchováván ve stabilní formě oxalátové soli. Postup syntézy je znázorněn na **Obr. 18**.

Jako první **a)** se 3-bromo-2,2-bis(bromomethyl)-1-propanol a tetrabutylammonium hydrogen sulfát převede do vhodné nádoby s dusíkem. Během míchání směsi se přidá toluen, následně 50 % vodný roztok hydroxidu sodného a při 23 °C se směs míchá po dobu 23 hodin. Přidá se po uplynutí reakční doby destilovaná voda a opět se míchá po dobu 30 minut. Jednotlivé fáze se po určité době stání oddělí. Následně se k roztoku přidá tetrabutylammonium hydrogen sulfát, 50 % vodný roztok hydroxidu sodného, směs se zahřeje na 73 °C a během 10 minut se přikape benzylamin. Opět se směs zahřeje, tentokrát na 83 °C a míchá se 20 hodin. Po ochlazení se přidá destilovaná voda, následuje míchání 30 minut, opět se směs nechá stát a oddělí se jednotlivé fáze. Organická fáze se extrahuje 2M kyselinou octovou. Vodná fáze se extrahuje toluenem. Spojené organické fáze se vakuově zahustí při 40 – 50 °C za poskytnutí světle žlutého oleje 2-benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptanu, který se musí přechistit za vzniku 2-benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptanu hydrochloridu.

Přečištění **b)** se provede přidáním isopropanolu do vhodné nádoby spolu s 2-benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptanem, přikape se 4 M kyselina chlorovodíková v dioxanu a teplota se udržuje na 0 – 5 °C. V tomto teplotním rozmezí se míchá 40 minut. Suspenze se zfiltruje a promyje methyl-terc-butyletherem. Látku je třeba vysušit a nadále se použije k syntéze **c)** požadovaného spirocyklického jádra.

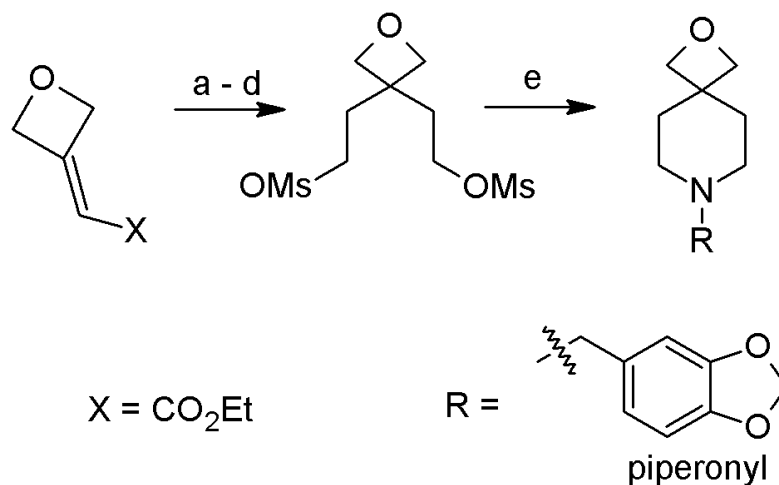
2-Benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptan hydrochlorid se převede do vhodné nádoby, přidá se destilovaná voda, methyl-terc-butylether a nasycený 5 M roztok hydroxidu sodného se přidává až do pH 13. Poté se směs míchá po dobu 30 minut a směs se extrahuje. Vodná fáze se extrahuje s methyl-terc-butylether. Spojené organické fáze

se vakuově zahustí a získá se 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan ve formě světle žlutého oleje. Výtěžek je 99 % (Golden et al., 2016).



**Obr. 18:** Schéma možné přípravy 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu II : a) Příprava suroviny 2-benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptanu, 90 %; b) Přečištění za vzniku hydrochloridu 2-benzyl-6-oxa-2-azaspiro[3.3]heptanu, 55 %; c) Výsledná syntéza 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu, 99 %. Vysvětlivky: Aq NaOH = vodný roztok hydroxidu sodného,  $Bu_4N^+HSO_4^-$  = tetrabutylammonium hydrogen sulfát, *i*-PrOH = isopropanol, MTBE = methyl-terc-butylether (převzato a upraveno z Golden et al., 2016).

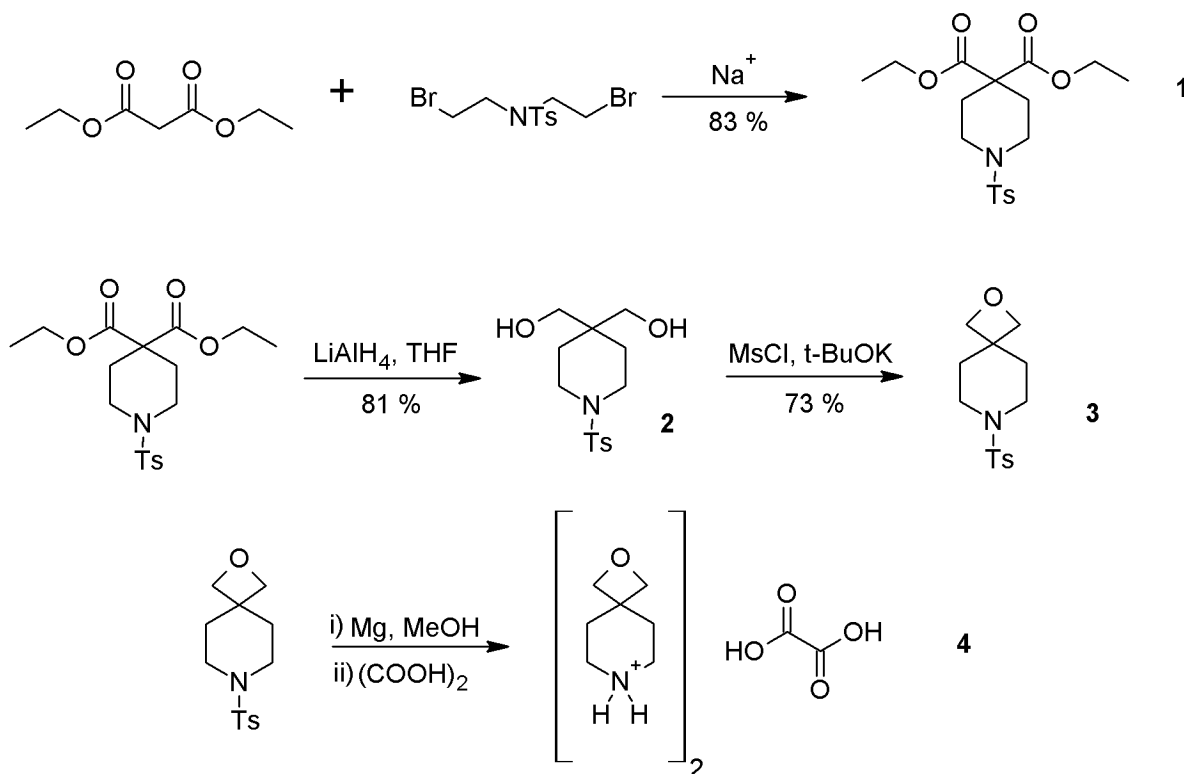
Další spirooxetan byl připraven z nestabilního a drahého 3-oxetanonu se substituovaným konjugátem  $CO_2Et$ , a syntéza pokračovala sledem několika kroků (**Obr. 19**).



**Obr. 19:** Schéma možné přípravy 2-oxa-7-azaspiro[3.5]nonane: a)  $H_2C(CO_2Me)_2$ , NaH; b) NaCl, DMSO, 160 °C, 82 %; c)  $LiAlH_4$ ; d) MsCl,  $NEt_3$ ; e)  $R'NH_2$ , 38 %. Vysvětlivky: Ms = methansulfonyl,  $NEt_3$  = triethylamin (převzato z Wuitschik et al., 2008).

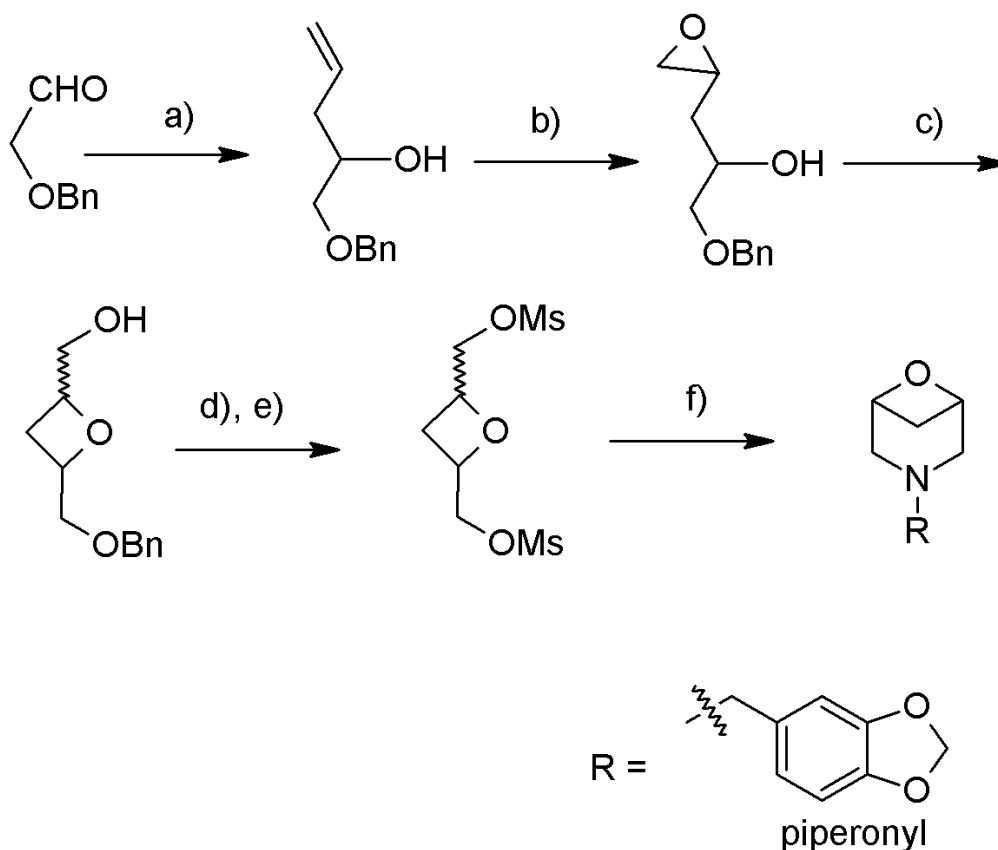
Uvedený syntetický přístup je sice komerčně dostupný, ale relativně drahý. Proto byl navržen další možný přístup (**Obr. 20**).

*N*-Tosylpiperidin-4,4-diethyl ester (**1**) se připraví reakcí diethylmalonátu s *N*-tosylbis(2-bromethyl)aminem. Redukcí hydridu lithno-hlinitého se získá diol (**2**), který se podrobí mesylaci a dochází k uzavření oxetanového kruhu (**3**). Tosylová skupina se odstraní sonifikací s práškovým hořčíkem v methanolu, následným mícháním s diethyletherem a dekahydrátem síranu sodného. Po zfiltrování je možné vytvořit oxelátovou sůl přidáním bezvodé kyseliny šťavelové k filtrátu (**4**) (Gurry et al., 2015).



**Obr. 20: Schéma možné přípravy 2-oxa-7-azaspiro[3.5]nonan anebo také oxalátové soli 2-oxa-7-azaspiro[3.5]nonanu:** Schéma zobrazuje nejnovější přístup nejen i) k syntéze 2-oxa-7-azaspiro[3.5]nonanu, ale také k ii) vytvoření soli za použití daného derivátu (převzato z (Gurry et al., 2015).

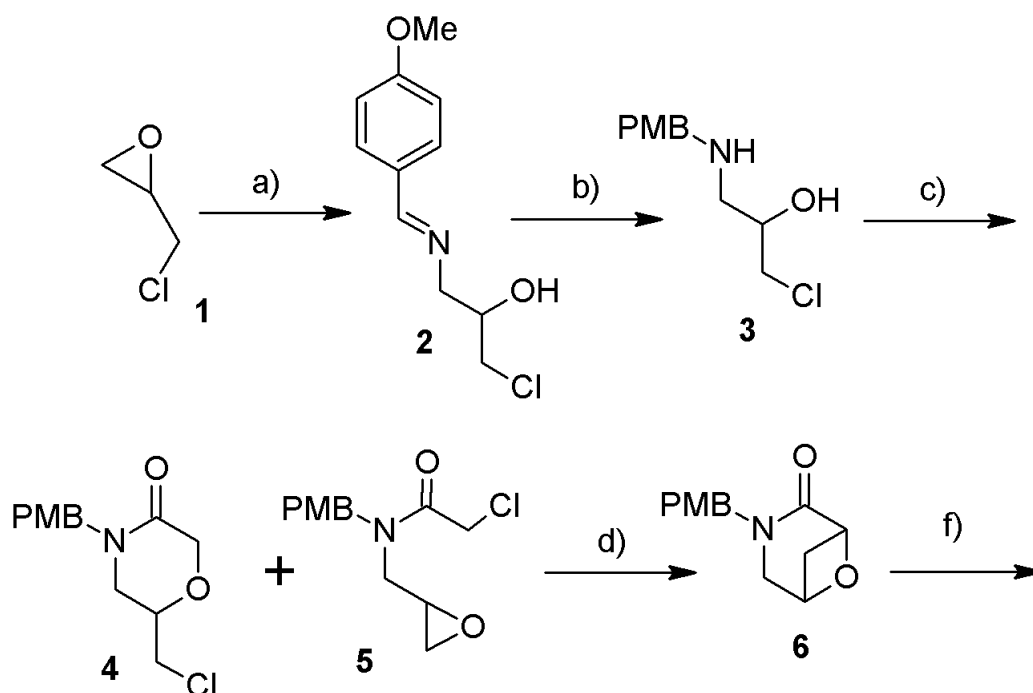
6-Oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan byl syntetizován z (4-ethyloxetan-2-yl)methanolu krátkou třístupňovou reakcí, kdy vzniká 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptanový analog s piperonylovou skupinou, kterou lze odstranit hydrogenolýzou (**Obr. 21**) (Wuitschik et al., 2008; Wishka et al., 2011).



**Obr. 21:** Schéma možné přípravy 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptanu **I** : a) Allylmagnesium bromid, Et<sub>2</sub>O, 0 °C, reflux, 83 %; b) MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 12 hodin, 84 %; c) Bu<sub>3</sub>SnOMe, 120 – 220 °C, 3 hodiny, 32 %; d) H<sub>2</sub>, 20 % Pd(OH)<sub>2</sub>/C, MeOH; 2 hodiny; e) MsCl, pyridin, 0 °C, přes noc; f) piperonylamin, dioxan, reflux, 16 hodin, 20 %. Vysvětlivky: Bn = benzyl, Ms = methansylfonyl, MCPBA = kyselina m-chlorperoxybenzoová, Bu<sub>3</sub>SnOMe = tributylinmethoxid. (převzato a upraveno z Wuitschik et al., 2008; Wishka et al., 2011).

Další možný přístup popisuje kolektiv Donn G. Wishka (**Obr. 22.**), kdy se v roce 2011 podařilo připravit 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan hydrotosylát. Jako první provedli reakci **a**) (4-methoxyfenyl)methanaminu (vytvořeného in situ z 4-methoxy-benzaldehydu a koncentrovaného vodného roztoku amoniaku) s epichlorhydrinem (**1**) za vzniku iminu (**2**). Reakce **b**) pokračovala redukcí iminu (**2**) za použití borohydridu sodného v methanolu vzniká 1-chloro-3((4-methoxymenbzl)amino)propan-2-ol (**3**). Dále zmiňují, že v původním postupu syntézy reagoval epichlorhydrin přímo s (4-methoxyfenyl)methanaminem bez následné redukce za vzniku (**3**). Ovšem tento postup je méně výnosný, zatímco dvoufázový optimalizovaný postup poskytuje (**3**), jak ve větším množství, tak i ve vyšší čistotě. Reakce **c**) chloracetyl chloridu s (**3**) poskytuje  $\alpha$ -chloramid (**4**), který s koncentrovaným vodným roztokem hydroxidu sodného umožní uzavření morfolinového kruhu a za stejných podmínek po 4 hodinách reakčního času

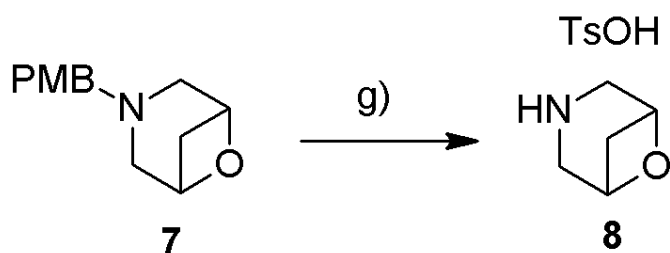
vzniká také v malém zastoupení epoxid (**5**). Následovala intramolekulární cyklizační reakce, kdy vychlazený (0°) roztok morfolinu (**4**) reagoval s hexamethyldisilazidem draselným (jakožto silná bázi) za vyprodukování laktamového enolátu, který prochází následnou intramolekulární alkylací s primárním alkylchloridem za vzniku (**6**). Redukce **f**) karbonylové skupiny laktamu bylo dosaženo za pomoci boran-dimethyl sulfidového komplexu a následným zpracováním byl vyprodukován achirální morfolin (**7**) (pokračování na **Obr. 23**).



**Obr. 22: Schéma možné přípravy 6-Oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptanu II :**  
**a)** (4-Methoxyfenyl)methanamin a epichlorhydrin, 92 %; **b)** redukce NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C, po dobu 1 hodiny **c)**; 1. produkt vytvořen ClCH<sub>2</sub>COCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, vodný roztok NaOH, 0 °C, po dobu 1 hodiny, 73 % (**4**); 2. produkt vytvořen za stejných podmínek: 40% vodný roztok NaOH, laboratorní teplota, po 4 hodinách, méně než 10 % (**5**); **d)** KHMDS, toluene-THF (1:1), 0 °C po dobu 1,5 hodin; **e)** BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub>, THF, 0 °C, 24 hodin. Vysvětlivky: OMe = methoxy skupina, PMB = 4-methoxybenzylková protektivní skupina, NaBH<sub>4</sub> = borohydrid sodný, ClCH<sub>2</sub>COCl = chloracetyl chlorid, KHMDS = hexamethyldisilazid draselný, BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> = boran-dimethyl sulfidový komplex (převzato a upraveno z Wishka et al., 2011).

K syntéze konečného produktu (**8**) bylo potřeba odstranit chránící 4-methylbenzylovou (PMB) skupinu. Tento krok zkoušely i jiné skupiny chemiků, přičemž syntézy vedly ke vzniku komplexních směsí produktů nebo pouze malému množství produktu (**8**) či k reakci vůbec nedošlo. 4-methoxybenzylková skupina byla nakonec odstraněna

hydrogenolýzou sloučeniny (7) za přítomnosti monohydrátu kyseliny 4-toluensulfonové za vzniku bicyckického morfolinu (8). Redukční aminací (8) s piperonalem poskytuje terciální amin popsáný v prvním přístupu (str. 46) (Wishka et al., 2011).



**Obr. 23:** Schéma možné přípravy 6-Oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptanu II-b: a)  $H_2$ ,  $Pd(OH)_2$ ,  $TsOH \cdot H_2O$ ,  $MeOH$ , 36 hodin, 84 %. Vysvětlivky:  $TsOH \cdot H_2O$  = monohydrát kyseliny 4-toluensulfonové (převzato a upraveno z Wishka et al., 2011).



### 3.3 Farmakologický potenciál heterospirocyklů jako alternativních farmakoforů

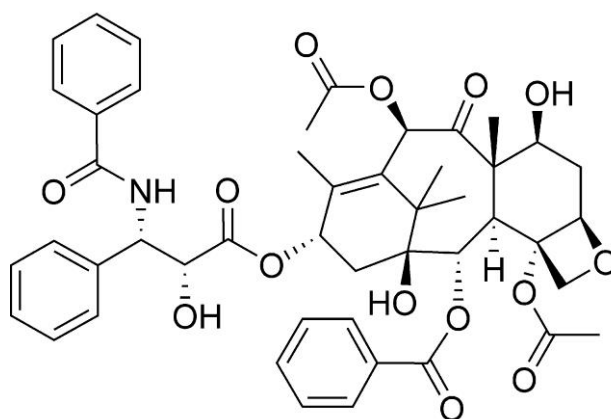
#### 3.3.1 Obecné principy

Oxetany, které začínají být v poslední době opět předmětem zájmu v medicínské chemii, byly v minulosti z velké části opomíjeny z důvodu pracného syntetického přístupu a obav o chemickou a metabolickou stabilitu. Ovšem na druhou stranu jejich pozitivní vlastnosti jako třeba ovlivnění rozpustnosti ve vodě, lipofilnosti nebo metabolické stability při nahrazení běžně používaných funkčních skupin například gem-dimethylových či karbonylových, přispělo k dalším výzkumům tohoto nadějného heterocyklu (Wuitschik et al., 2010).

Co se týče fyzikálních vlastností tak oxetan sám o sobě je čtyřčlenný kruh obsahující atom kyslíku. Prstenec zaujímá v podstatě planární strukturu s úhlem otáčení  $8,7^\circ$  při 140 K a  $10,7^\circ$  při 90 K. Délka vazby uhlík – kyslík v nesubstituovaném oxetanu je 1,46 ångström (Å) a délka vazby uhlík – uhlík je 1,53 Å, a to vede k vazebným úhlům  $90,2^\circ$  (C-O-C),  $92,0^\circ$  (C-C-O) a  $84,8^\circ$  (C-C-C), což bylo identifikováno rentgenovou difrakční analýzou při 90 K (Luger a Buschmann, 1984). Deformovaný úhel vazby C-O-C odhaluje kyslíkový pár elektronů umožňující oxetanu působit jako vynikající akceptor vodíkové vazby (Searles a Tamres, 1951). Velkou výhodou oxetanů je schopnost působit jako akceptor H-vazeb s většinou karbonylových funkčních skupin jako například s alifatickými ketony, aldehydy a estery, ovšem dokonce s amidy poskytují jako o něco lepší akceptory (Wuitschik et al., 2010).

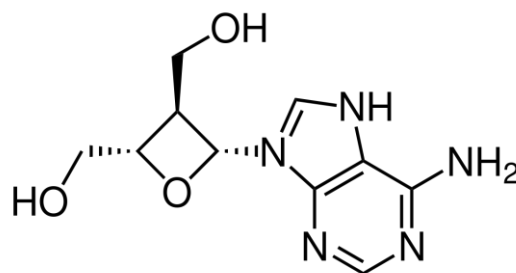
Oxetanový kruh se objevuje v poměrně malém počtu přírodních produktů, ale pokud je již přítomen, tak významná biologická aktivita je často způsobena právě přítomností oxetanové struktury. Na **Obr. 24** lze vidět významnou látku paclitaxel zvaný také jako Taxol, která byla poprvé izolována v roce 1971 z kmenové kůry západního tisu *Taxus brevifolia* a využívá se v chemoterapii rakoviny díky jeho antileukemickým a tumor inhibujícím vlastnostem (Wani et al., 1971). Bylo prokázáno, že během buněčného dělení Taxol působí na mikrotubuly a stabilizuje je během buněčného dělení tím, že narušuje rovnováhu mezi tubulinem a mikrotubuly a zastavuje se tak buněčné dělení, ale konformace, ve které se Taxol váže na mikrotubuly a skutečné vazebné místo nejsou podrobně známy. Navrženy byly různé hypotézy o významu oxetanového kruhu v souvislosti s aktivitou Taxolu. Bylo proto předmětem zkoumání nahrazení atomu kyslíku v oxetanovém kruhu jiným heteroatomem, aby došlo k objasnění, zda úloha oxetanového

kruhu je primárně konformační (zda acetoxy skupina přijímá orientaci v prostoru příznivou pro interakci s mikrotubuly) nebo primárně elektronová (zda se přímo podílí na vázání receptoru svým kyslíkovým atomem prostřednictvím vodíkových vazeb). Nahrazením kyslíku sírou v oxetanovém kruhu způsobilo významné snížení aktivity tubulinu. V souladu se zjištěním, že nahrazení kyslíku dusíkem také způsobuje výrazné snížení aktivity podporuje hypotézu, že oxetanový kyslík působí jako akceptor vodíkové vazby a atom kyslíku v oxetanovém kruhu hraje důležitou roli v mechanismu, kterým Taxol vykazuje svou protinádorovou aktivitu (Gunatilaka et al., 1999). Přesto nedávné studie ukázaly, že oxetan nemusí být ve skutečnosti nezbytný pro biologickou aktivitu Taxolu (Wang et al., 2015).



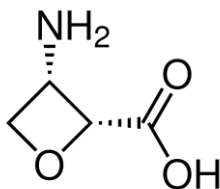
**Obr. 24: Paclitaxel (Taxol):** struktura látky izolované z *Taxus brevifolia*

Z přírodních zdrojů byly izolovány také další sloučeniny obsahující oxetan. Oxetanocin A (**Obr. 25**) byl izolován z půdních bakterií *Bacillus megaterium* a prokázal aktivitu vůči herpes simplex viru II a pozorována byla silná antibakteriální aktivita proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* a *Bacillus cereus* (Shimada et al., 1986).



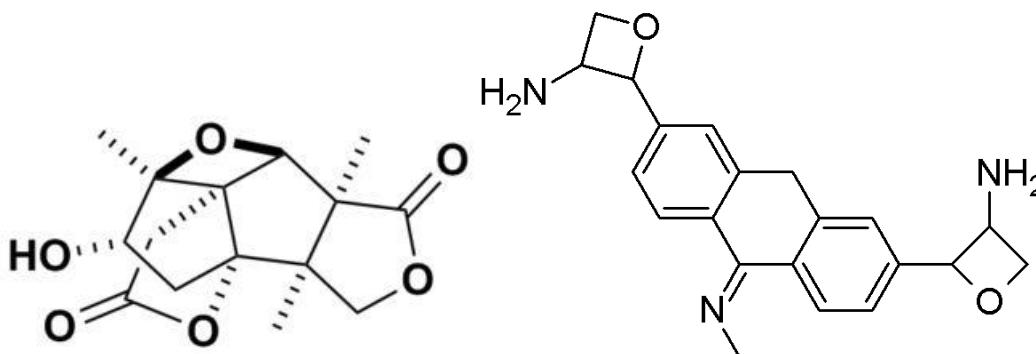
**Obr. 25: Oxetanocin A:** struktura látky izolované z *Bacillus megaterium*

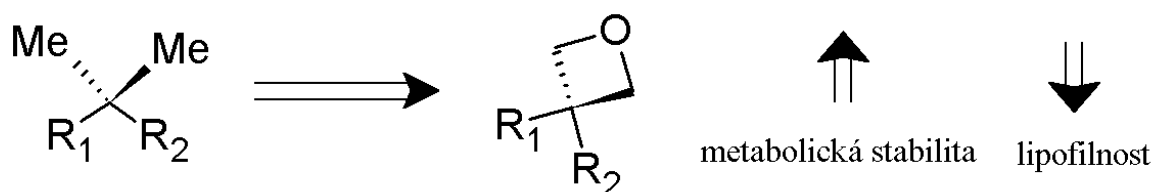
Další látkou je oxetin (**Obr. 26**), izolován ze *Streptomyces sp.* OM-2317. Jedná se o první přírodní produkt obsahující oxetanový kruh s prokázanými antibakteriálními a herbicidními účinky (Omura et al., 1984).



**Obr. 26: Oxetin:** struktura látky s antibakteriálními a herbicidními účinky

U látky zvané merrilakton A (**Obr. 27**), izolované z oplodí rostliny *Illicium merrillianum*, se ukázalo, že stimuluje u krys růst neuronů (Huang et al., 2000; Inoue et al., 2006). A pak také bradyoxetin (**Obr. 27**), produkovaný půdní bakterií *Bradyrhizobium japonicum* stojí za zmínku. Obsahuje totiž hned dva oxetanové kruhy (Loh et al., 2002).





**Obr. 28:** Hlavní výhody zavedení oxetanů místo gem-methylové skupiny: oxetan jakožto značně polárnější ekvivalent gem-dimethylové skupiny zajistí u látek vyšší metabolickou stabilitu, ale zároveň snižuje lipofilnost (převzato a upraveno z Wuitschik et al., 2006).

Jakožto modelová sloučenina, u které se zkoumal účinek nahrazení gem-dimethylové jednotky za oxetan, byla zvolena lipofilní a zároveň amfifilní látka N,N-dimethyl-4-(p-tert-butylphenyl)butylamin. Po zavedení oxetanové jednotky se látka stala značně polárnější a více rozpustná (Wuitschik et al., 2006).

**Tab. 4:** Tabulka porovnávající fyzikálně-chemické vlastnosti látek se substituovanou oxetanovou jednotkou.

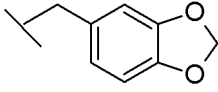
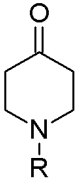
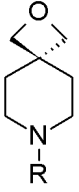
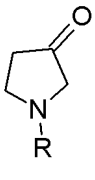
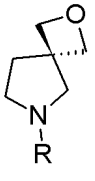
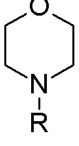

| Látka | Termodynamická rozpustnost<br>$\mu\text{g/ml}^{-1}$ | Lipofilnost<br>$\log D (\log P)$ | $\text{pK}_a$ |
|-------|---|----------------------------------|---------------|
|       | <1  | 1,8 (4,3)                        | 9,9           |
|       | 4000  | -0,1 (2,4)                       | 9,9           |
|       | 6100  | -0,5 (2,0)                       | 9,9           |
|       | 4400  | 0,8 (3,3)                        | 9,9           |

Termodynamická rozpustnost v jednotkách  $\mu\text{g/ml}^{-1}$  byla měřena v 50 mM fosfátovém pufru při pH 9,9 a  $22,5 \pm 1$  °C. Logaritmické rozdělení ( $\log D$ ) oktanol/voda při pH 7,4. Vlastní lipofilnost neutrální báze ( $\log P$ ) (Převzato a upraveno z Wuitschik et al., 2006).

Použití oxetanů jako náhradních skupin za karbonylové skupiny (aldehydy, ketony a estery) vedlo k řadě prospěšných změn. Karbonylové sloučeniny, které mají podobné dipóly a vlastnosti vodíkových vazeb jako oxetany, jsou citlivé na vliv enzymů

a deprotonaci/epimerizaci stereogenních center. Ovšem oxetany jsou, jak se zdá, vůči tomu stabilní. V následující tabulce jsou shrnuty pro porovnání zjištěné fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti různých spirocyklických sloučenin obsahujících oxetan a jejich odpovídající heterocyklické deriváty obsahující karbonyl (Wuitschik et al., 2008).

**Tab. 5: Tabulka porovnávající fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti různých spirocyklických sloučenin obsahujících oxetan a jejich heterocyklické deriváty s karbonylovou skupinou.**

| R= piperonyl   | Rozpustnost<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) | Lipofilnost<br>logD (logP) | $\text{hCL}_{\text{int}}$<br>( $\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}/\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup> | $\text{mCL}_{\text{int}}$<br>( $\text{min}^{-1}/\text{mg}^{-1}/\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup> | $\text{PK}_{\text{a}}$ |
|--|---|----------------------------|--|--|------------------------|
|             |   |                            |  |  |                        |
| <b>1</b>    | 4000  | 1,2 (1,6)                  | 120  | 88   | 7,5                    |
| <b>2</b>   | 1400  | 1,0 (2,0)                  | 6  | 22   | 8,3                    |
| <b>3</b>  | 4100  | -0,1 (-0,1)                | 100  | 580  | 6,1                    |
| <b>4</b>  | 730   | 0,7 (1,5)                  | 2  | 27   | 8,1                    |
| <b>5</b>  | 8000  | 1,5 (1,6)                  | 9  | 8  | 7,0                    |
| <b>6</b>  | 24000   | 0,5 (1,2)                  | 3  | 7  | 8,0                    |

U derivátů **2** a **4** po začlenění oxetanového kruhu došlo ke snížení rozpustnosti. Byly však pozorovány protichůdné účinky na lipofilnost. Co se týče ale metabolické stability u derivátů **2** a **4**,

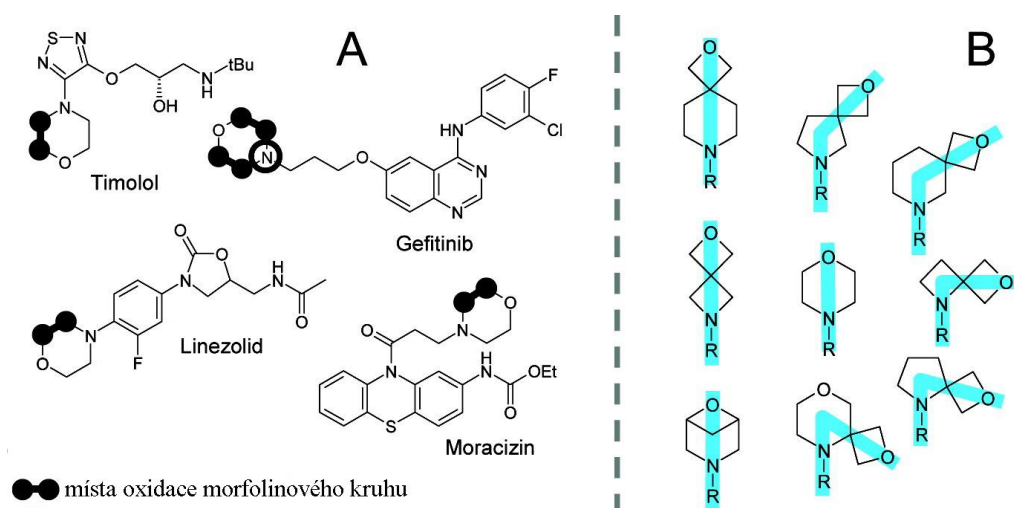
*tak došlo k jejímu značnému zlepšení. Rychlost vnitřní clearance byla měřena na lidských mikrozomech jater (h) a na myších (m). Zásaditost aminů ve vodě byla měřena spektrofotometricky při 24 °C. (Převzato a upraveno z Wuitschik et al., 2008).*

Pro zlepšení rozpustnosti léků ve vodě se začleňují do jejich struktury morfolinové kruhy, ale přestože zlepší lepší rozpustnost, naopak mohou takovéto sloučeniny procházet nežádoucím oxidačním metabolismem. Vzhledem k podobným strukturním vlastnostem byl navržen spirocyklický oxetanový derivát **6**. Ve srovnání s morfolinem **5** má spirocyklický oxetan **6** zvýšenou rozpustnost ve vodě, sníženou lipofilnost, zatímco zůstává metabolicky stabilní vůči oxidaci (Wuitschik et al., 2008). Byly uváděny také spirocyklické struktury jakožto strukturní analogy heterocyklů včetně piperazinu a piperidinových a thiomorfolinových analogů (Burkhard a Carreira, 2008; Burkhard et al., 2010).

Jako součást studie zaměřené na zkoumání farmakoforů se zkoušelo také zavedení oxetanů do aromatických a heteroaromatických systémů. Řada takovýchto sloučenin byla hodnocena *in vitro* screeningem při inkubaci s lidskými jaterními mikrozomy za přítomnosti glutathionu a NADPH za účelem detekce reaktivních metabolitů. Ve více než polovině případů nebyly pozorovány žádné konjugáty glutathionu, což poskytuje důkaz toho, že oxetan-3-yl může být atraktivní strukturou pro medicínskou chemii (Dunton et al., 2008).

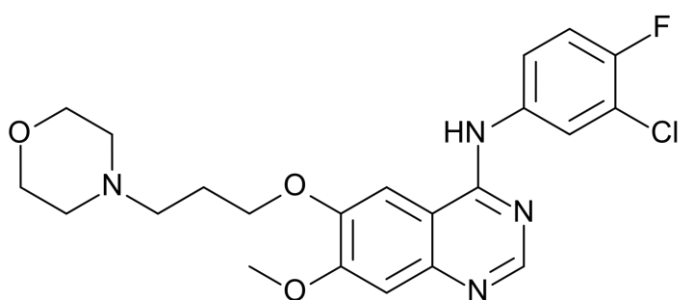
### **3.3.2 Příklady využití heterospirocyklických látek pro úpravu vybraných biologických vlastností**

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, rozpustnost lipofilních struktur se často zlepšuje zavedením morfolinové jednotky i přestože se předpokládá, že právě morfolin podléhá oxidačnímu metabolismu. Na trhu k roku 2010 bylo známo 17 na trhu dostupných léčivých látek obsahujících morfolinový zbytek. U 8 z těchto léčiv byla prokázána oxidační degradace morfolinového kruhu. Na **Obr. 29** je uvedeno několik komerčně známých léčiv s morfolinovou jednotkou (Wuitschik et al., 2010).



**Obr. 29: Přehled vybraných léčiv:** A) Léky citlivé vůči metabolické oxidaci - prodávané běžně na trhu obsahující morfolinovou jednotku. B) Spirocyclické oxetany, které by mohly být použity místo morfolinové jednotky (Převzato a upraveno z Wuitschik et al., 2010).

Prvním perorálně podávaným inhibítorem EGFR uvedeným na trh je gefitinib (**Obr. 30**). Gefitinib je rozsáhle metabolizován cytochromem P450 a to CYP3A4 a CYP2D6. Oxidace morfolinového kruhu, oxidační defluorace a O-demethylace methoxy substituentu na quinazolinovém jádře představují hlavní cesty metabolismu gefitinibu. Díky CYP3A4 jsou produkovány metabolity M537194, M608236 a M387783, zatímco CYP2D6 působí na metabolismus gefinitibu velmi rychle a extenzivně a vzniká tak jeho hlavní metabolit O-desmethyl gefitinib (M523595). Monitorování metabolitů je důležité hlavně z důvodu minimalizace rizika lékových interakcí a toxicity podávaného farmaka (Zheng et al., 2016).

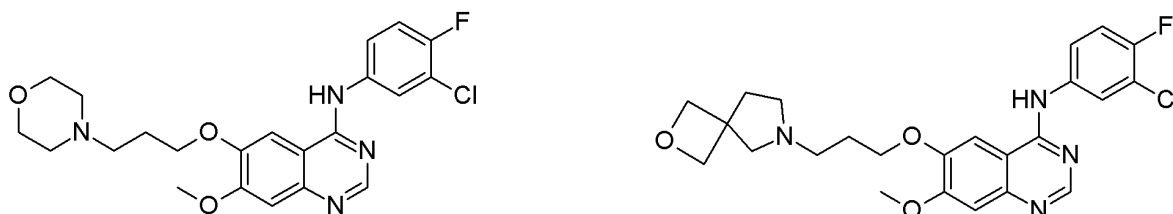


**Obr. 30: Gefitinib**

U myších modelů hlavní cestou metabolismu gefinitibu byla především oxidace morfolinového kruhu, u psů kromě toho probíhala i O-demethylace. Byly také provedeny studie metabolismu u zdravých lidských dobrovolníků, u kterých gefitinib byl metabolizován podobně jako u psů. Informace z lidských studií nebyly obsáhlé vzhledem

k relativně nízkým podávaným perorálním dávkám. Přesto určité množství metabolitů bylo pozorováno v plasmě, přičemž koncentrace hlavního metabolitu M523595 byla srovnatelná s koncentrací samotného léčiva (McKillop et al., 2004).

Jako příklad modifikace gefitinibu heterospirocyclickou sloučeninou je uvedena látka se substituovaným 2-oxa-6-azaspiro[3.4]oktanem (**Obr. 31**).



**Obr. 31:** Gefitinib (nalevo) a látka s nahrazenou morfolinovou jednotkou (napravo).

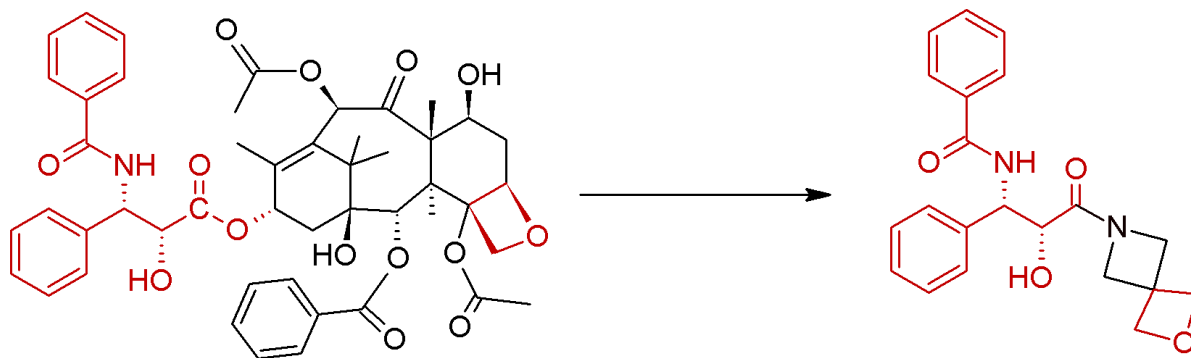
Látka byla podrobena imnhibičnímu testu tyrosinkinázové aktivity pro EGFR. Studovala se také *in vitro* buněčná cytotoxicita proti lidským plicním rakovinným buněčným liniím HCC8027 a A549 s gefitinibem jako pozitivní kontrolou. Buněčná linie HCC8027 nese EGFR-aktivační mutace a je reprezentativní buněčnou linií řízenou EGRF. Buněčná linie A549 byla použita k vyhodnocení efektů buněčné toxicity. Ve srovnání s gefitinibem modifikovaná sloučenina obsahující 2-oxa-6-azaspiro[3.4]oktan má vysokou aktivita proti EGFR a HCC827 ( $IC_{50} = 15$  nM pro EGFR a 28 nM pro HCC827). Rozpustnost ve vodě oproti gefitinibu je také mnohem vyšší ( $33,8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  pro novou látku a  $2,1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  pro gefitinib).

*In silico* experimenty jen potvrzují výsledky získané *in vitro*. Ukotvením sloučeniny do trojrozměrné struktury komplexu EGFR, došlo k navázání látky na stejném místě jako gefitinib. Tyto výsledky dokazují, že nahrazení morfolinové části gefitinibu čtyřčlennými jednotkami vzniká možnost modifikace inhibice EGFR a *in vitro* protinádorové aktivity (Zhao et al., 2013).

Již v předchozí kapitole zmíněný paclitaxel neboli pod komerčním názvem známý Taxol, je důležitým chemoterapeutikem v současné klinické léčbě rakoviny prsu, vaječníků, malobuněčného karcinomu plic a rakoviny prostaty. Urychluje polymerizaci mikrotubulů a stabilizuje dělení buněk ve fázi G2/M a zároveň stimuluje apoptózu nádorových buněk. Vzhledem k jeho silným protirakoviným účinkům byl proveden výzkum zabývající se vztahem mezi strukturou látky a její aktivitou (SAR). Současný výzkum SAR u paclitaxelu ukázal, že jedinečné oxetanové kruhy a postranní řetězce jsou nepostradatelnými aktivními skupinami, jelikož analogy paclitaxelu bez oxetanového

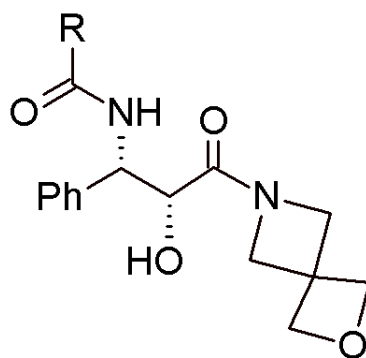


kruhu nebo postranního řetězce vykazovaly významné snížení nebo dokonce ztrátu požadované aktivity. Nakonec byla syntetizována dvě nová paclitaxelová mimetika obsahující 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan. Na **Obr. 32** je zobrazena struktura paclitaxelu a vytvořené mimetikum, ze kterého se dále vycházelo při syntézách nových mimetik.



**Obr. 32:** *Struktura paclitaxelu (nalevo) a paclitaxelového mimetika (napravo): z mimetika napravo se vycházelo při dalších syntézách.*

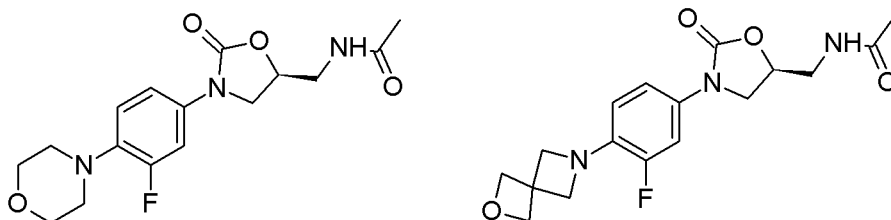
Obě navržená mimetika prokázala dobrou rozpustnost ve vodě na rozdíl od špatné rozpustnosti protirakovinných taxoidů. Mimetikum **1** i **2** (**Obr. 33**) byla testována s cílem stanovení koncentrací potřebných k inhibici rozpadu mikrotubulů. Hodnoty  $IC_{50}$  u nově syntetizovaných mimetik byly sice nízké, ale oproti paclitaxelu ovšem velmi významné. Provedeny byly také testy pro antiproliferační aktivitu a ukázalo se, že obě mimetika vykazují mírné antiproliferační účinky. Obzvláště stojí za zmínku to, že mimetika mají příznivé účinky proti nádorovým buněčným liniím citlivým na paclitaxel, a naopak vykazují relativně nízké účinky proti nádorovým buněčným liniím necitlivým na paclitaxel. Tudíž, mají pravděpodobně podobný protirakovinový mechanismus jako paclitaxel (Chen at al., 2014).



- 1 R = Ph
- 2 R = *t*BuO

**Obr. 33:** *Nová paclitaxelového mimetika*

Také léčivo linezolid bylo modifikováno nahrazením morfolinového kruhu 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanem. Kromě toho byly provedeny i vedlejší modifikace, a to náhrada *N*-acetylového konce různými aromatickými nebo alifatickými funkčními skupinami. Přičemž nejlepší profil jevila látka na **Obr. 34** (Gadekar et al., 2016).



**Obr. 34:** *Struktura linezolidu (nalevo) a modifikovaného linezolidu (napravo): uvedená látka modifikovaná náhradou morfolinu za 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan s nejlepší antibakteriálním profilem z řady jiných modifikovaných látek. Zde proběhla pouze náhrada morfolinu, *N*-acetylový konec byl ponechán.*

Linezolid se používá zejména díky jeho účinkům proti enterokokům, stafylokokům a dalším gram-positivním bakteriím, včetně bakterií rezistentních na methicillin a vancomycin. Linezolid schválil Úřad kontroly potravin a léčiv a klinické studie publikovaly pozitivní účinky linezolidu u pacientů s komplexními infekcemi kůže či infekcemi MRSA (Methicilin-Rezistentní Staphylococcus Aureus) a dalšími (Li a Xu, 2017).

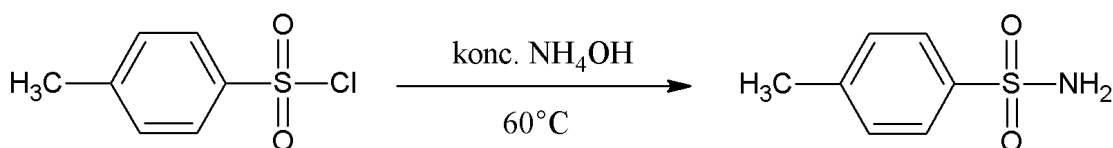
Výsledný analog linezolidu s 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanem byl podroben zkoumání antibakteriální a antituberkulární aktivity. Sloučenina si zachovala antibakteriální profil

jako linezolid s výjimkou úplné abrogace neboli zastavení aktivity *Escherichia coli*. Antituberkulární aktivita se také zachovala. U dalších testovaných kmenů bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*) se aktivita analogu příliš nelišila od linezolidu (Gadekar et al., 2016).

## 4. DOSAŽENÉ VÝSLEDKY

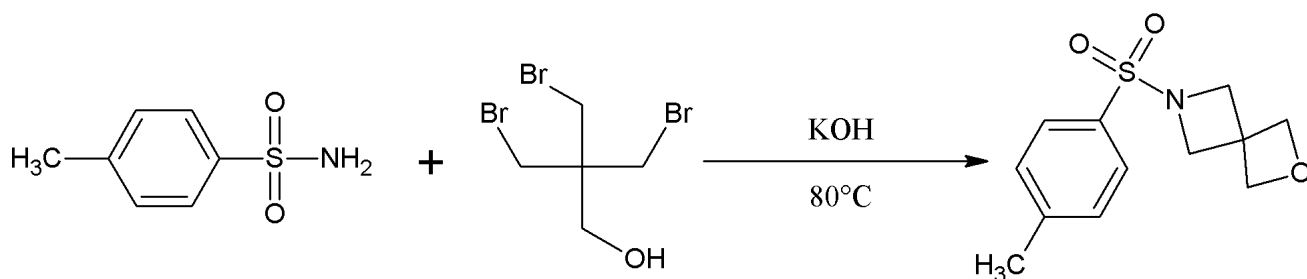
Následující kapitola pojednává o dosažených výsledcích a zahrnuje vybrané klíčové prekurzory a inhibitory včetně schémat příslušných reakcí. Podrobné postupy včetně zpracování látek jsou k nalezení v kapitole 5.2 v případě klíčových prekurzorů a v kapitole 5.3 popisující přípravu cílových inhibitorů.

### 4.1 Syntéza klíčových prekurzorů



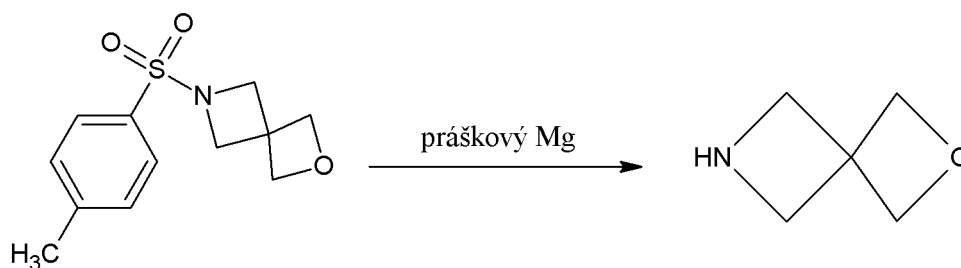
*Obr. 35: Schéma přípravy tosylamidu (1)*

Prvním krokem byla syntéza tosylamidu (1) (dle Ledesma et al., 2009), který jsem připravila reakcí 4-toluensulfonylchloridu s amoniakem ve vodném prostředí. Reakce probíhala při teplotě 60 °C po dobu 60 minut v dobrém výtěžku a čistotě.



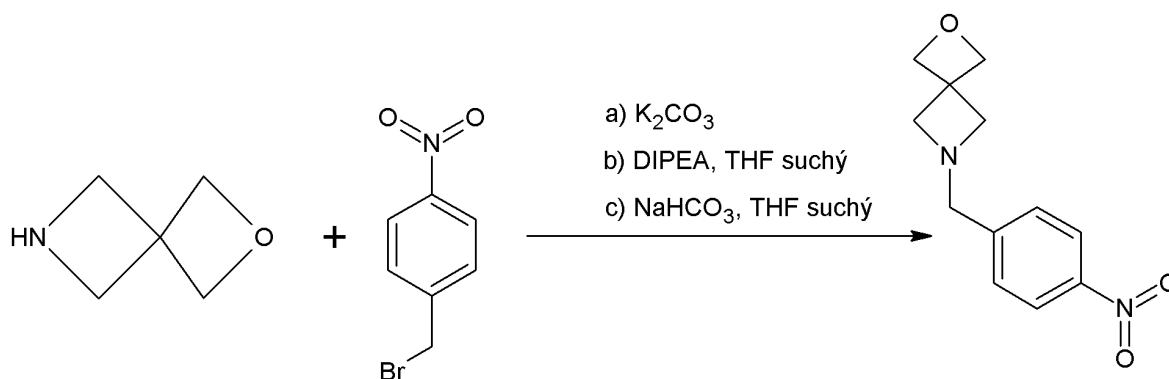
*Obr. 36: Schéma přípravy N-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (2)*

Dále jsem využila tosylamid (1) pro syntézu *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (2). Jedná se o reakci, kdy je dle literatury dosaženo výtěžku okolo 76 % (Chen et al., 2014). V tomto případě jsem ale dosáhla výtěžku 54 %, ale za to vysoké čistoty. Dle Gadekar et al., 2016 je popsán postup přípravy, kde reakční doba je snížena při 90 °C na 48 hodin za získání výtěžku 57,7 %, ale v mém případě kratší reakční doba nestačila.



**Obr. 37:** Schéma deprotektce *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (2) za vzniku 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (3)

Během této reakce bylo nutné odstranit chránící skupinu tosyly sonifikací s práškovým hořčíkem (dle Chen et al., 2014). Vzhledem k tomu, že jsem 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (2) připravovala v několika protokolech, nejvhodnější reakční doba pro tuto reakci jsou 2 až 3 hodiny, přestože v literatuře je zmiňována 1 hodina. Výsledný produkt je nestabilní a je nutné jej uchovávat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



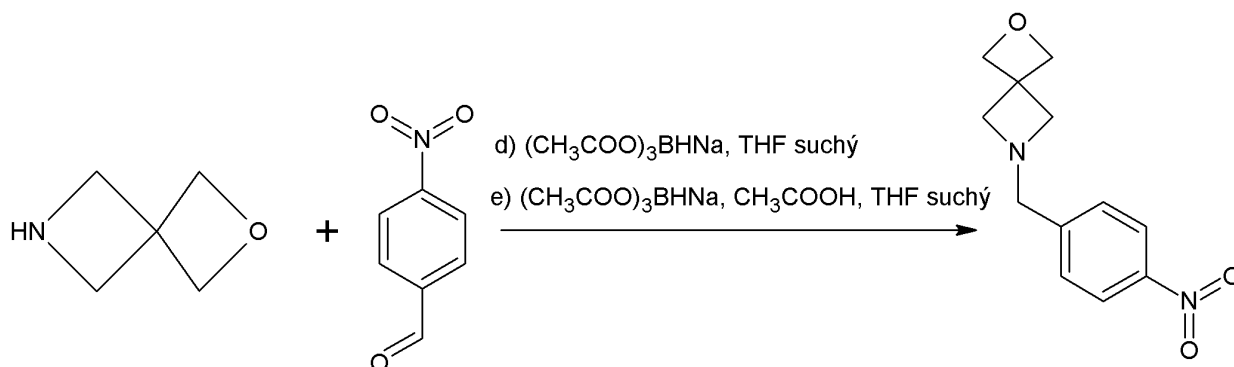
**Obr. 38:** Schéma přípravy 6-(4-nitrobenzyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (4) nukleofilní substituce na brom

Pro přípravu tohoto prekurzoru se vyzkoušelo několik přístupů.

V prvním přístupu **a)** jsem provedla reakci 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (3), s 4-nitrobenzylbromidem a uhličitanem draselným rozpuštěným v bezvodém ethanolu a směs byla zahřívána při  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 hodin. Přestože při TLC kontrole s mobilní fází hexan-ethylacetát 3:1 nebyla výchozí látka přítomna (ověřeno následnou ninhydrinovou reakcí), bylo na desce přítomných pět různých produktů.

V druhém přístupu **b)** 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (3) reagoval sází DIPEA, 4-nitrobenzylbromidem a suchým THF. I po 12 hodinách reakce byla výchozí látka dle TLC kontroly přítomna.

V poslední přístupu **c**) byla DIPEA nahrazena hydrogenuhlíčanem sodným a směs se míchala při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin. Po skončení reakční doby jsem provedla TLC kontrolu, tentokrát s mobilní fází hexan-ethylacetát 1:1. Výchozí látka nebyla přítomna, ale na desce se vyskytovaly 3 skvrny. Produkt jsem čistila kolonovou chromatografií na silice. Dle výsledné HPLC analýzy nebyl získán žádaný produkt (**4**).

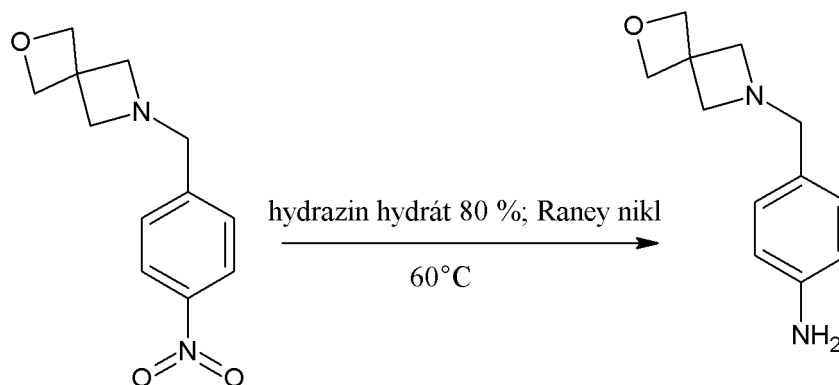


**Obr. 39: Schéma přípravy 6-(4-nitrobenzyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (**4**) principem reduktivní aminace**

Reduktivní aminace byla úspěšně provedena dle Fujimoto et al., 2017 s tím rozdílem, že byl použit 4-nitrobenzaldehyd v 1,2-dichloroethanu a přidán byl rac-2-methylmorfolin hydrochlorid a po 30 minutách se přidal triacetoxyborohydrid sodný. Výtěžek byl 54 %.

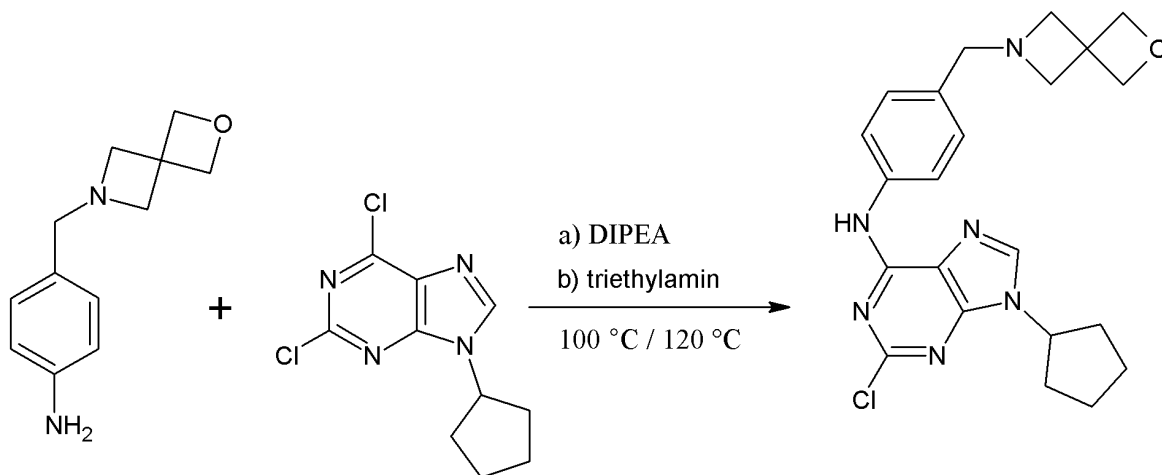
Ná základě výše zmíněné úspěšné syntézy žádaného prekurzoru (**4**) jsem s ním **d**) provedla reakci spolu s 4-nitrobenzaldehydem, triacetoxyborohydem sodným a suchým THF. Směs se za laboratorní teploty míchala. Postupně jsem přikapala 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (**3**) a v inertní atmosféře se směs míchala po dobu 20 hodin. Výtěžek odpovídal 57 %. Látka byla směsí produktu a (4-nitrofenyl) methanolu v poměru 2:1 a proto jsem produkt čistila kolonovou chromatografií.

Provedla jsem analogický postup **e**) kde byla pouze přidána kyselina octová. Látku (**4**) jsem musela opět vyčistit na koloně, ale výtěžek odpovídal pouze 17 % a proto předchozí přístup k syntéze je patrně vhodnější.



**Obr. 40:** Schéma přípravy 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylmethyl)anilinu (5)

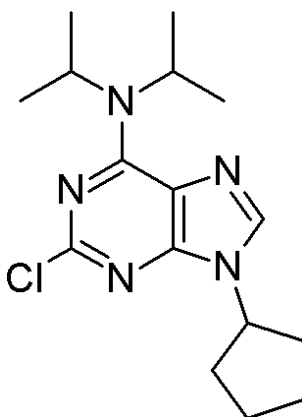
Pro redukci nitroskupiny u 6-(4-nitrobenzyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (4) bylo zvoleno použití Raney niklu. Ten spolu s produktem (4) byl rozpuštěn v methanolu a následně zahříván a míchán při 60 °C za současného chlazení. Postupně jsem přikapávala 80 % hydrazin hydrát. Směs se zpracovala, přidala jsem následně vodu a přikapávala 1M kyselinu chlorovodíkovou až do pH 2. Produkt jsem extrahovala s dichlormethanem, vodnou fází zneutralizovala 1M hydroxidem sodným na pH 8 a vytřepala s ethylacetátem. Produkt byl připraven v dobré čistotě.



**Obr. 41:** Dva vyzkoušené způsoby přípravy *N*<sup>2</sup>-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylmethyl)anilin)-2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin (6) principem nukleofilní substituce přes chlor do polohy C<sup>6</sup>

V prvním přístupu a) jsem látku 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylmethyl)anilinu (5) následně použila pro nukleofilní substituci na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin do polohy C<sup>6</sup>. Prekurzor (5) reagoval za přítomnosti báze DIPEA

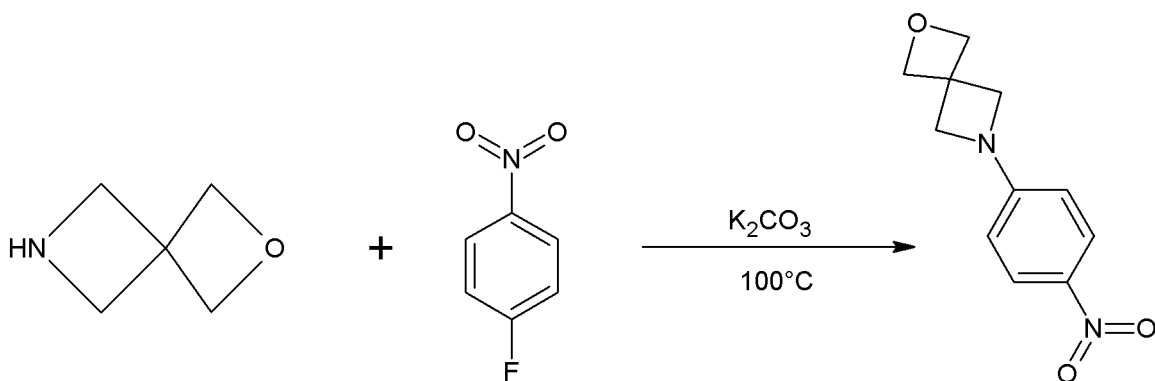
s 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinem a směs se zahřívala na 120 °C po dobu 20 hodin. Jako vhodná mobilní fáze pro TLC kontrolu byl použit toluen-ethylacetát v poměru 1:1. Přesto dle výsledků HPLC analýzy se syntéza produktu (6) nepodařila. Jako pravděpodobný produkt je 2-chlor-9-cyklopentyl-*N,N*-di(propan-2-yl)-9H-purin-6-amin, který je dle HPLC analýzy zastoupen z 91 % (Obr. 42).



**Obr. 42:** Pravděpodobný produkt nukleofilní substituce prekursoru (5) na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin do polohy C<sup>6</sup>

b) Vzhledem k tomu, že báze DIPEA nemusela být v této reakci vhodná, vyzkoušela jsem přípravu látky (6) analogicky, ale s triethylaminem (TEA) při 100 °C. Opět nebyl syntetizován požadovaný produkt a výsledná látka nebyla dle HPLC analýzy čistá a ani nebylo vhodné ji čistit kolonovou chromatografií.

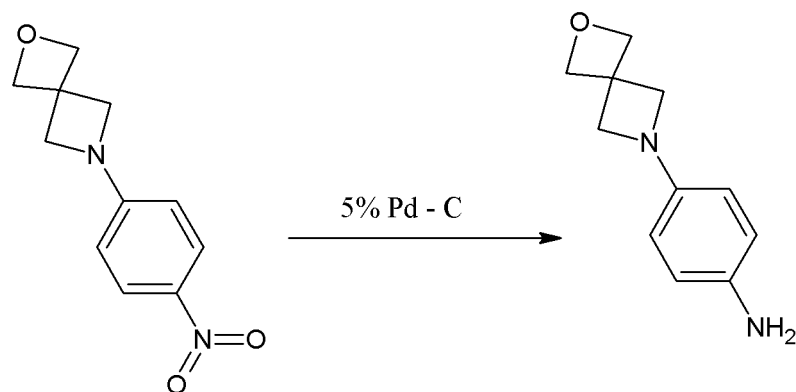
Na základě předešlých neúspěchů jsem tedy pokračovala v syntéze dalšího prekursoru.



**Obr. 43:** Schéma přípravy látky 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (6)

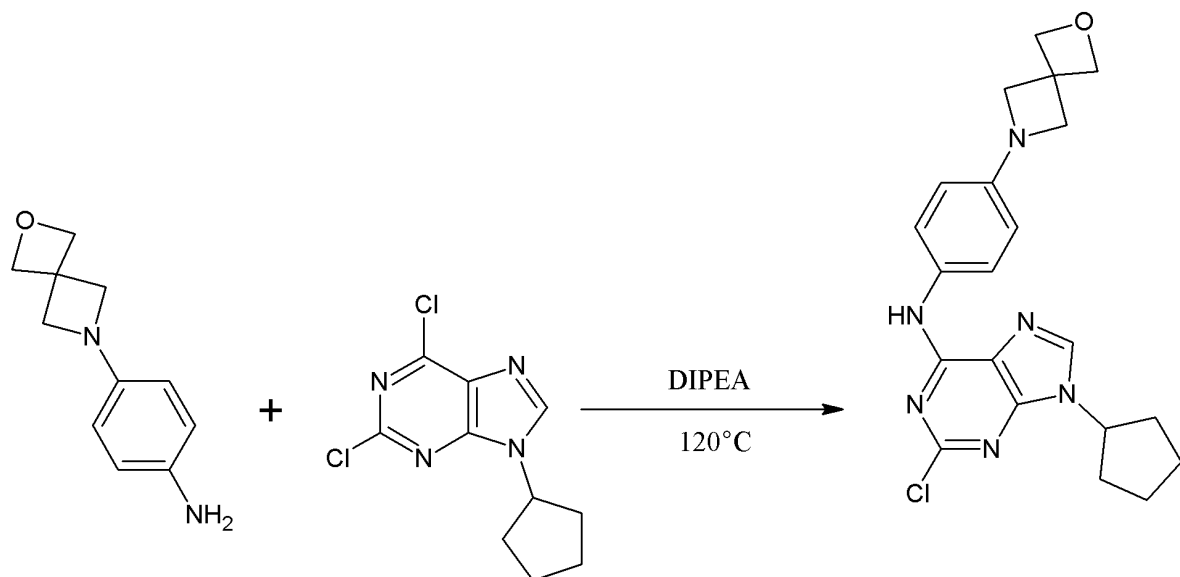


Opět jsem provedla nukleofilní substituci přes fluor. 2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (**3**) spolu s uhličitanem draselným rozpuštěným v bezvodém ethanolu byl zahříván na 100 °C. Reakci jsem ukončila po 2 hodinách dle výsledku TLC s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 1:1. Výslednou žlutou krystalickou jsem nechala krystalizovat s ethylacetátem při -20 °C přes noc. Výsledný produkt (**6**) byl připraven v dobré čistotě.



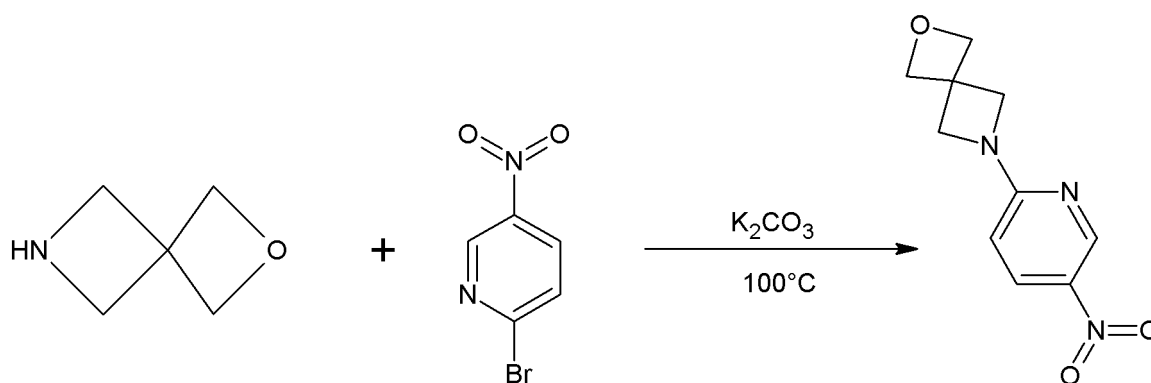
**Obr. 44: Schéma přípravy 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)anilinu (**7**)**

V následujícím kroku jsem provedla redukcí nitroskupiny. Hydrogenace 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (**6**) s 10 % palladiem na aktivním uhlí a methanolem proběhla při spotřebě 150 ml H<sub>2</sub>. TLC kontrolu jsem provedla s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 1:1, přičemž výchozí látka nebyla přítomna. Produktem byla bílá krystalická látka, která stáním na vzduchu růžoví. Dosáhla jsem výtěžku 94 %.



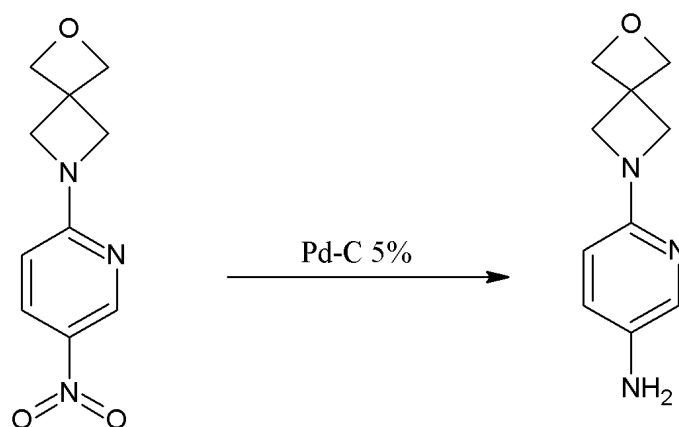
**Obr. 45:** Schéma nukleofilní substituce na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin za vzniku *N*-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-aminu (8)

Provedla jsem další nukleofilní substituci 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)anilinu (7) polohy C<sup>6</sup> na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu. Prekurzor (7) rozpuštěný v *n*-propanolu, za přítomnosti báze DIPEA byl s 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinem zahříván na 120 °C a míchán po dobu 36 hodin. Mobilní fázi pro TLC kontrolu jsem použila CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1. Když jsem látku zchladila na laboratorní teplotu, začala se vylučovat nažloutlá krystalická látka. Vzhledem k čistotě látky (8) (97 %), jsem ji použila k dalším substitucím do polohy C<sup>2</sup> (viz kapitola 4.2).



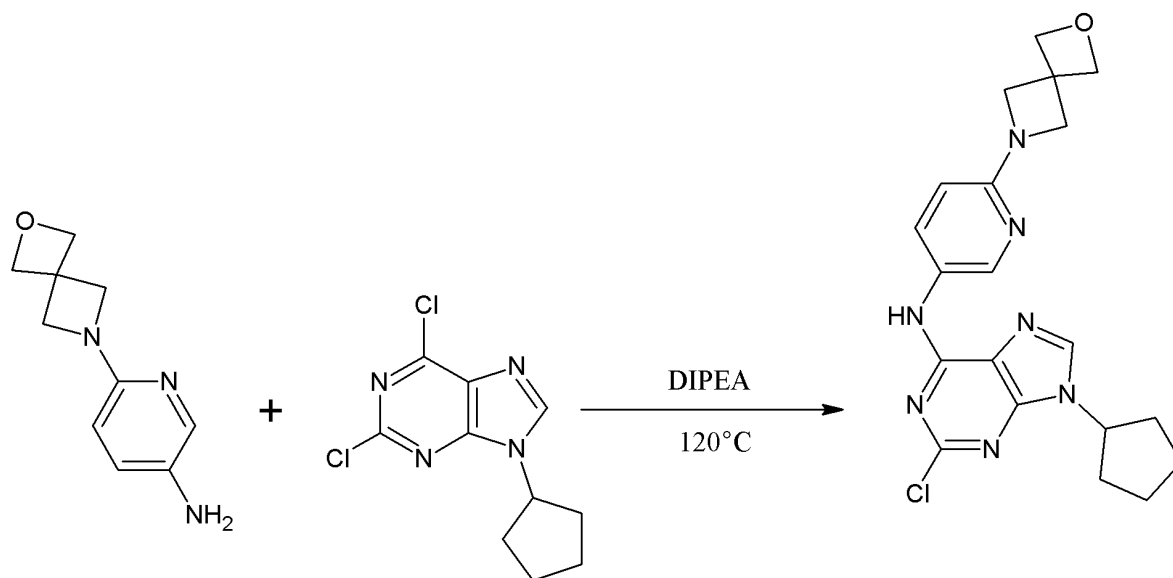
**Obr. 46:** Schéma přípravy 6-(5-nitropyridin-2-yl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (9) principem nukleofilní substituce přes brom

V následujícím experimentu jsem provedla nukleofilní substituci 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (3), ale tentokrát na 2-bromo-5-nitropyridin přes brom. Ke zmíněným substancím jsem přidala uhličitán draselný a bezvodý ethanol a reakci nechala běžet při 100 °C po dobu dvou hodin, kdy jsem udělala TLC kontrolu. Mobilní fáze byla použita hexan-ethylacetát v poměru 3:1. Výchozí látka nebyla ještě všechna zreagovaná, proto jsem reakci prodloužila o další hodinu a nyní již nebyla výchozí látka přítomna. Po zpracování byla odňata žlutá krystalická látka (9), která přes noc krystalizovala s vychlazeným ethylacetátem. Látka vykazovala dle HPLC 100 % čistotu.



**Obr. 47:** Schéma přípravy 6-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)pyridin-3-aminu (**10**)

Následovala redukce nitro skupiny, které jsem použila 10 % palladium na karbonu jako katalyzátor celé reakce. Reakce 6-(5-nitropyridin-2-yl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (**9**), s palladiem běžela až do teoretické spotřeby  $H_2$ . Konec reakce jsem si ověřila TLC kontrolou s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 3:1. Čistota produktu dle HPLC byla 92 % a použila se k následující substituci.



**Obr. 48:** Schéma nukleofilní substituce na 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin za vzniku *N*-(6-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)pyridin-3-yl)-2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-aminu (**11**)

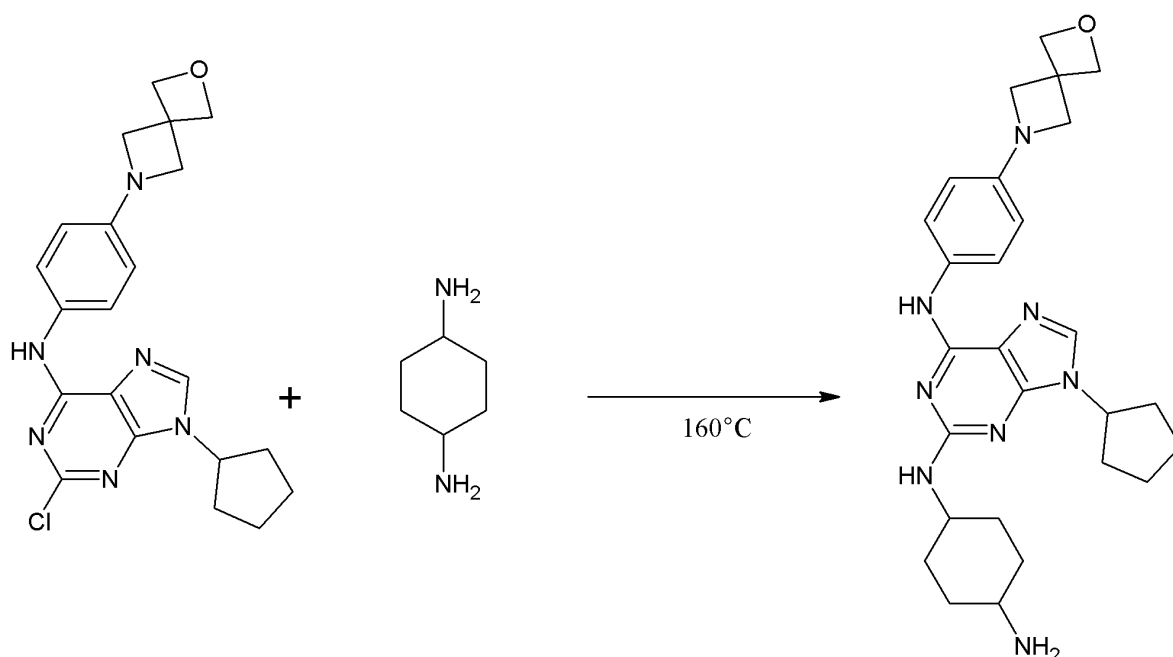
Prekurzor (**10**) jsem rozpustila v *n*-propanolu a spolu s 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinem za přítomnosti báze DIPEA směs byla míchána a zahřívána na 120 °C po dobu

36 hodin. TLC kontrolu s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 1:1 jsem provedla po 24 hodinách reakce, přičemž výchozí látka byla stále přítomna a patrně i 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin. Tudíž jsem reakci nechala běžet naplánovaných 36 hodin. Produkt jsem následně čistila kolonovou chromatografií s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 1:1. Produkt bohužel nebyl na koloně zachycen, patrně na základě toho, že byl zastoupen pouze z 31 % (dle výsledku analýzy HPLC).

## 4.2 Syntéza cílových inhibitorů

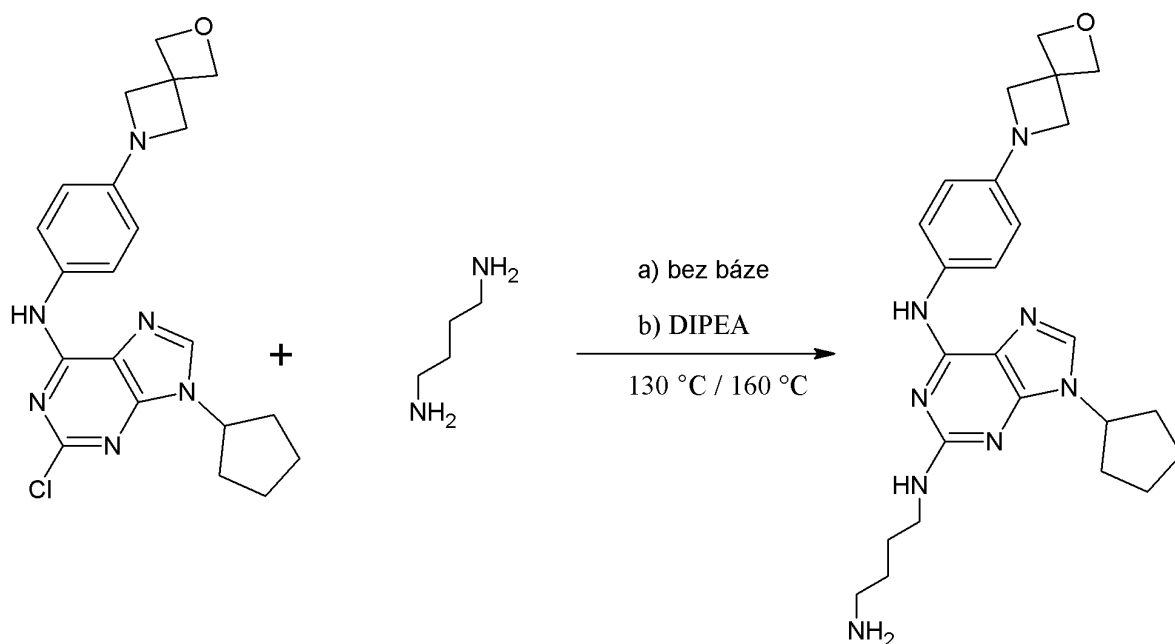
Prekurzor (**8**) jsem využila pro následující substituce do polohy C<sup>2</sup>. Při zpracovávání všech cílových inhibitorů jsem postupovala analogicky, proto uvádím postup zde.

Zpracování produktů **12**, **13**, **14**, **15** a **16**: po ochlazení roztoku bylo přilita voda a látka se extrahovala 3× s ethylacetátem. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny síranem sodným bezvodým, zfiltrovány a filtrát byl vakuově zahuštěn. K odparku byl přidám dichlormethan pro lepší vysušení a znovu vakuově zahuštěn.



**Obr. 49:** Schéma přípravy látky *N*<sup>6</sup>-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-*N*<sup>2</sup>-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2,6-diaminu (**12**) mechanismem nukleofilní substituce na C<sup>2</sup>

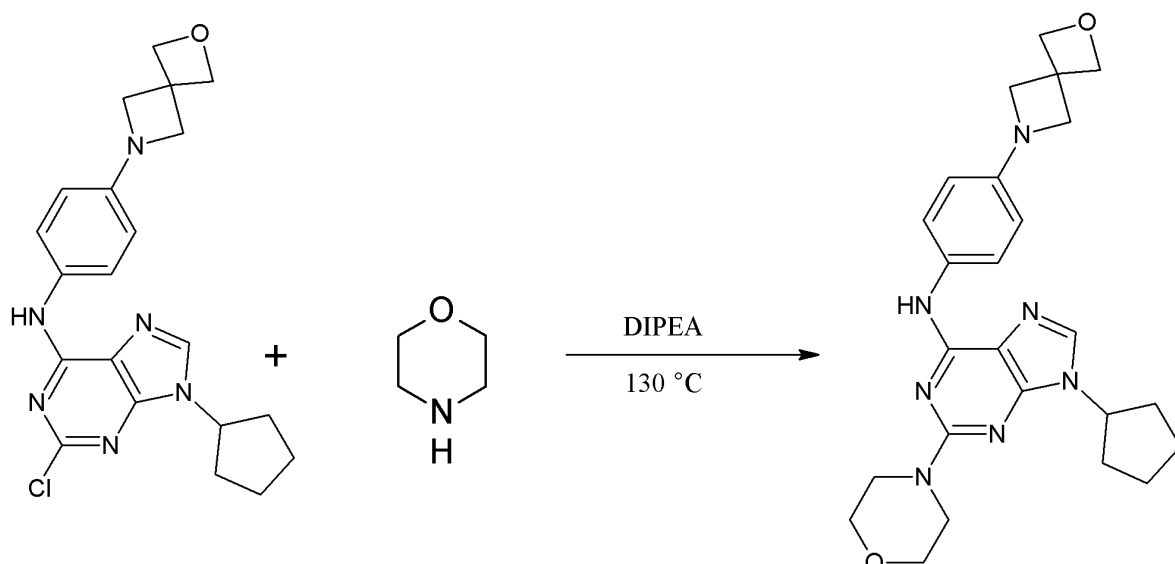
Prekurzor (**8**) jsem rozpustila v ethylenglykolu a přikapala trans-1,4-diaminocyklohexan a směs byla míchána a zahřívána na 160 °C po dobu 200 minut. Pro TLC kontrolu se použila mobilní fáze CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH v poměru 4:1:0,05. Výchozí látka byla v malém množství přítomna. Látku jsem zpracovala. Surový produkt jsem čistila kolonovou chromatografií se silikagelem a získala očekávanou látku (**12**).



**Obr. 50:** Schéma přípravy  $N^6$ -(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)- $N^2$ -(4-aminobutyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (**13**) mechanismem nukleofilní substituce na  $C^2$

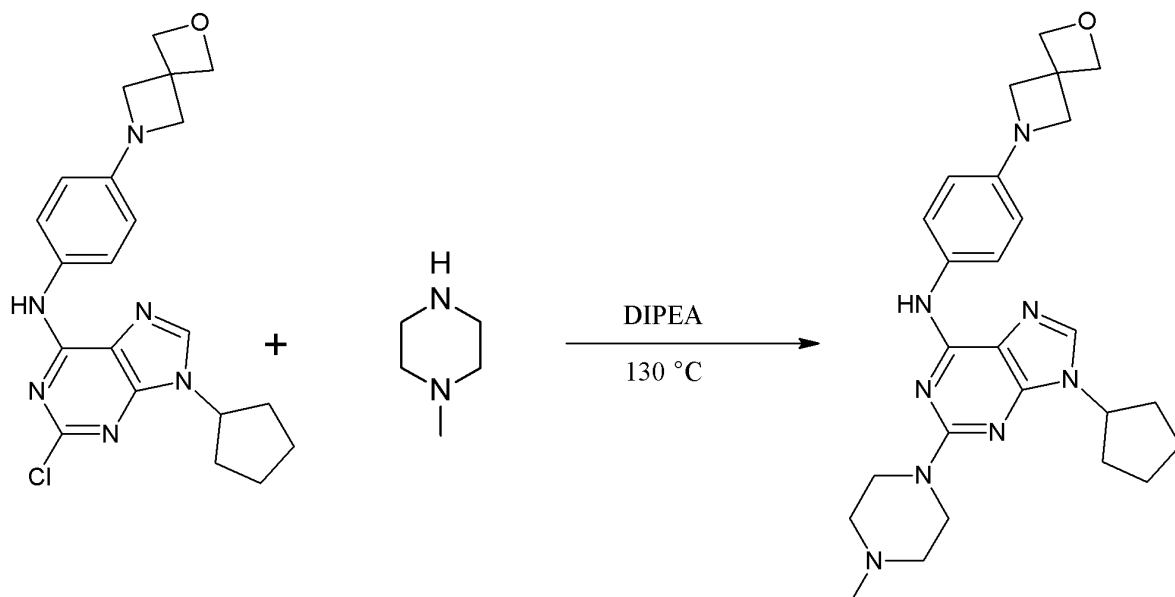
K syntéze látky (**13**) jsem použila dva přístupy. Jako první **a**) jsem provedla substituci bez báze, kdy prekurzor (**8**) jsem rozpustila v ethylenglykolu a přikapala putrescin. Směs se míchala a zahřívala při 160 °C po dobu 4 hodin. Výchozí látka po skončení reakční doby přítomna nebyla – TLC s mobilní fází  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  v poměru 4:1:0,05. Látku jsem zpracovala dle obecného postupu zpracování. Výsledkem byla hutná amorfnní látka. Dle HPLC analýzy nevznikl očekávaný produkt (**13**).

Zvolen byl proto jiný přístup **b**), tentokrát za přítomnosti báze DIPEA, kterou jsem přikapala k prekurzoru (**8**) a putrescinu. Reakční doba byla prodloužena na 24 hodin a teplota se nastavila na 130 °C. Mobilní fází pro TLC kontrolu jsem použila jako nejvhodnější hexan-ethylacetát v poměru 2:1 nebo 1:1. Tento reakční postup se osvědčil a produkt (**13**) byl pomocí něj úspěšně syntetizován, tudíž bez použití báze látku připravit nelze na rozdíl od (**12**), kde k syntéze báze nebyla třeba. Přesto je pravděpodobné, že s bazí by možná i tato syntéza proběhla lépe. Daný postup byl nakonec aplikován i na následující syntézy.



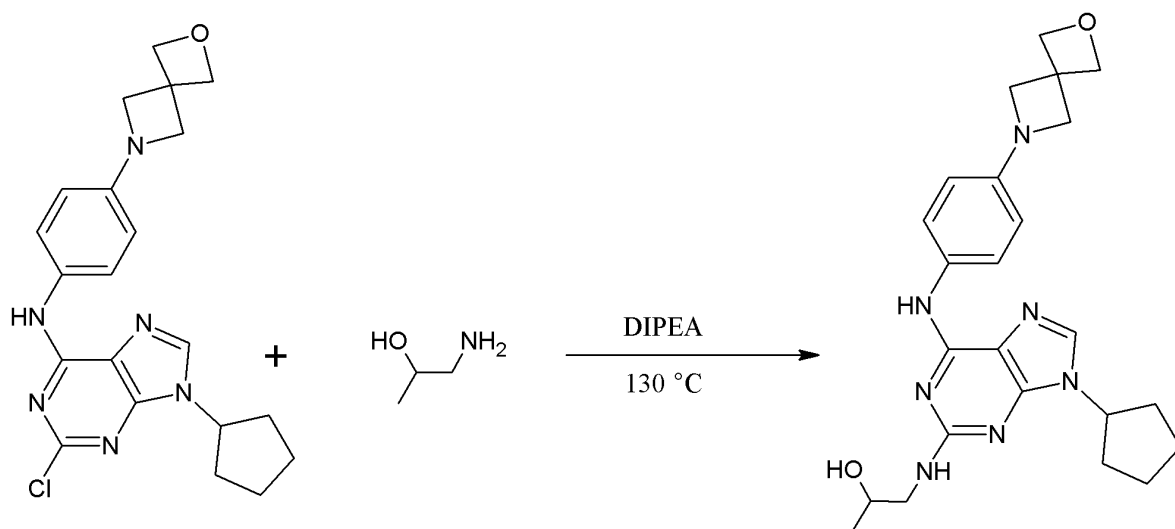
**Obr. 51:** Schéma přípravy *N*<sup>6</sup>-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-9-cyklopentyl-2-morfolin-9H-purin-6-aminu (14) mechanismem nukleofilní substituce na C<sup>2</sup>

Prekurzor (8), reagoval s morfolinem za přítomnosti báze DIPEA. Směs reagovala při 130 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení jsem provedla TLC kontrolu s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH v poměru 4:1:0,05 a CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1. Veškerá výchozí látka zreagovala a látku jsem následně zpracovala.



**Obr. 52:** Schéma přípravy *N*<sup>6</sup>-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-9-cyklopentyl-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-9H-purin-6-aminu (15) mechanismem nukleofilní substituce na C<sup>2</sup>

Prekurzor (**8**) reagoval s *n*-methylpiperazinem a DIPEA. Směs jsem nechala reagovat při 130 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení jsem provedla TLC kontrolu s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1. Výchozí látka byla zreagována. Produkt (**15**) jsem následně čistila kolonovou chromatografií.



**Obr. 53: Schéma přípravy 1-((6-((4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)amino)-9-cyklopentyl-9H-purin-2-yl)amino)propan-2-olu (**16**) mechanismem nukleofilní substituce na C<sup>2</sup>**

Prekurzor (**8**) reagoval společně s 1-amino-2-propanolem a DIPEA. Směs reagovala při 130 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení jsem provedla TLC kontrolu s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1 a také se osvědčila mobilní fáze Večerková – EtAc-MeOH-NH<sub>4</sub>OH v poměru 34:4:2. Výchozí látka byla zreagována. Produkt (**15**) jsem následně zpracovala podle obecného postupu. Výsledkem syntézy dle HPLC analýzy nebyla požadovaná látka (**15**).



## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiál a metody

V experimentální části diplomové práce byla čistota jednotlivých produktů kontrolována na hliníkových deskách pokrytých silikagelem WF 60 254 (Merck) tenkovrstevnou chromatografií (TLC). Pomocí UV lampy (Camag) byl při vlnové délce  $\lambda$  254 nm nebo 366 nm vizualizován výsledek TLC.

Výsledná spektra nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR) byla získána na spektrometru Jeol 500 od firmy Ltd při 500 MHz ( $^1\text{H}$  NMR) a 125 MHz ( $^{13}\text{C}$  NMR) a na spektrometru Bruker Avance AV 300 při frekvenci 300 MHz. Veškeré látky byly rozpuštěny v DMSO- $d_6$  a jednotky chemického posunu jsou udávány v ppm.

Čistota byla také kontrolována metodou HPLC na RP-sloupci (150 mm, 5 mm, 4,6 mm, Microsorb C18, Varian). Vzorky látek pro HPLC byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanесeny na kolonu, kde byly oddělené složky vymyty při průtoku 0,6 ml/min lineárním methanolickým gradientem. Detekce se prováděla skenováním UV absorbanсe eluátu při vlnových délkách 240 nm a 300 nm.

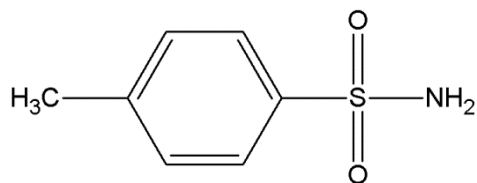
Čistění produktů bylo provedeno kolonovou chromatografií s využitím silikagelu o velikosti částic 230-400 mesh a velikosti pórů 60 Å.

Pro syntézu byly používány chemikálie od firmy Sigma-Aldrich a rozpouštědla od firmy Lach Ner, DMSO- $d_6$  od firmy Sigma-Aldrich a silikagel od formy Grace.

Pro vakuové zahuštění produktů byly používány vakuové odparky značky Heidolph Instruments. K potřebnému vysušení produktů do konstatní hmotnosti se využilo sušárny značky Memmert - UF 55.

## 5.2 Syntéza klíčových prekurzorů

### *p*-Tosylamid (1)



**Výtěžek:** 80 %

Bílá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S

**Mr** = 171,22

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 2,33 (s,3H, CH<sub>3</sub>); 7,24 (s(br),2H, NH<sub>2</sub>); 7,33 (d, *J*=4.8, 2H, ArH); 7,67 (d, *J*=4,8; 2H, ArH)

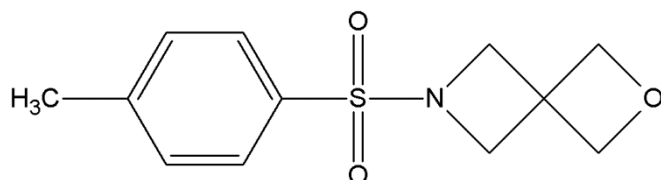
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 21,45; 126,15; 129,84; 141,95; 142,39

**HPLC-MS (ESI+):** 172,36 (99 %)

**Příprava:** K vodného amoniaku (0,536 mol) se za stálého míchání při laboratorní teplotě přidává tosylchlorid (0,1 mol). Po ukončení přidávání se směs zahřívá v baňce s kulatým dnem pod zpětným chladičem při teplotě 60 °C po dobu 60 minut. Výsledný produkt byl vakuově zahuštěn a následně vysušen ve vakuové sušárně do konstantní hmotnosti.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>3</sub>OH v poměru 4:1:0,05

### *N*-Tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (2)



**Výtěžek:** 54 %

Bílá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S

**Mr** = 253,31

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,81 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,38 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 7,44 (d, *J* = 8,0; 2H, ArH); 7,64 (d, *J* = 8,0; 2H, ArH)

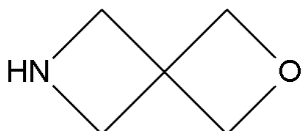
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 21,61; 37,48; 59,78; 79,45; 128,73; 130,48; 144,74

**HPLC-MS (ESI+):** 254, 37 (100 %)

**Příprava:** Směs KOH (215 mmol) a *p*-tosylamidu (80,6 mmol) byla rozpuštěna ve 100 ml ethanolu. Po přidání 3-bromo-2,2-bis(bromomethyl)propan-1-olu (67,17 mmol) se směs zahřívá v tlakové ampuli při 80 °C po dobu 90 hod za současného chlazení. Poté je směs vakuově odpařena, vzniká bílá krystalická látka. K odparku přidán 2M KOH (2 mol), dále 100 ml H<sub>2</sub>O a směs se míchá v baňce s kulatým dnem za laboratorní teploty po dobu 2 hod. Produkt je zfiltrován na fritě, promýván H<sub>2</sub>O do vymizení zbarvení.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 9:1

### 2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (3)



**Výtěžek:** 54 %

Průzračná olejovitá látka, nutné uchovávat při -20 °C

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO

**Mr** = 99,13

**<sup>1</sup>H NMR:** 7,69 (d, *J* = 8,4, 2H), 7,47 (d, *J* = 8,4; 2H), 4,42 (s, 4H), 3,85 (s, 4H), 2,41 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** 144,4; 130,9; 130,2; 128,5; 79,1; 59,5; 37,3; 21,3

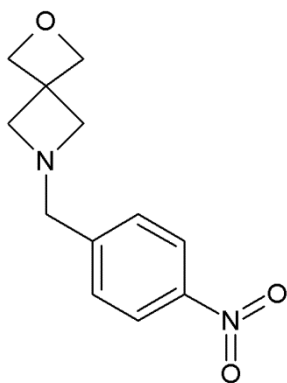
(Pozn. signál NMR nebyl patrný, proto bylo NMR spektrum převzato z Chen et al., 2014).

**Příprava:** V následujících krocích byla provedena deprotektace. *N*-Tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (19,7 mmol) (**2**) byl rozpuštěn ve 680 ml methanolu. Poté je přidán práškový hořčík (177,3 mmol) a směs je následně sonifikována pomocí ultrazvuku po dobu 3 hodin. Současně je směs chlazená a sensoricky odhadovaná teplota

odpovídá zhruba 40 °C. Úspěšná deproteckce je kontrolována pomocí TLC. Surová směs se zfiltruje přes křemelinu a vakuově se odpaří, přičemž vzniká bílá hutná látka. Následně se přidá 680 ml diethyletheru a 34,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 10H<sub>2</sub>O. Směs se intenzivně míchá po dobu 1 hod. Směs je zfiltrována, odňata je bílá krystalická látka. Filtrát je vysušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrován a vakuově zahuštěn. Výsledkem zahuštění je olejovitá látka, kterou je nutné uchovávat v mrazáku.

**TLC:** hexan-ethylacetát v poměru 3:1.

#### 6-(4-Nitrobenzyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (4)



**Výtěžek:** 57 %

**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Mr** = 234,25

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 3,29 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 3,60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,57 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 7,48 (d, *J*=8,5; 2H, ArH); 8,13 (d, *J*=8,5; 2H, ArH)

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 23,43; 61,99; 63,48; 80,33; 723,91; 129,59; 146,91; 173,97

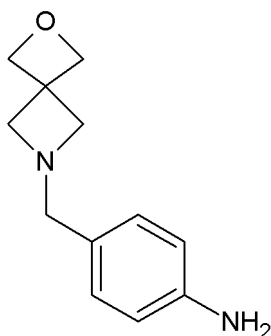
**HPLC-MS (ESI+):** 235,42 (98 %)

**Příprava:** K roztoku 4-nitrobenzaldehydu (2,00 mmol) a triacetoxyborohydridu (3,60 mmol) v 10 ml THF se za laboratorní teploty přikape 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (3,00 mmol) (3) a dále se míchá po dobu 20 hodin v inertní atmosféře za laboratorní teploty. Po skončení reakční doby bylo přidáno 10 ml methanolu a látka byla vakuově zahuštěna. Odparek byl rozdělen mezi 10 ml roztoku NaHCO<sub>3</sub> a 10 ml ethylacetátu. Vodná fáze byla ještě extrahována 2×10 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty

solankou, vysušeny  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrány a filtrát byl vakuově zahuštěn. Produkt byl dále čištěn na silica gelu.

**TLC:** hexan-ethylacetát v poměru 1:1

#### 4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylmethyl)anilin (5)



**Výtěžek:** 49 %

**Sumární vzorec:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$

**Mr** = 24,26

**$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):** 3,14 (s, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ ); 3,22 (s(br), 2H,  $\text{NH}_2$ ); 4,53 (s, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ ); 6,43 (d,  $J=8,0$ , 1H, ArH); 6,82 (d,  $J=8,0$ ; 1H, ArH)

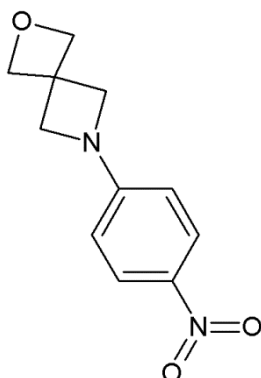
**$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):** 38,77; 62,99; 80,68; 114,17; 125,57; 128,61; 129,53; 148,04

**HPLC-MS (ESI+):** 205,42 (82 %)

**Příprava:** 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylmethyl)anilin (0,21 mmol) (**4**) byl převeden do baňky s kulatým dnem, následně bylo přidáno cca 10 mg Raney niklu a 5,0 ml methanolu. Směs byla zahřívána a míchána při 60 °C a současně chlazena po dobu 2 hodin. Postupně byl přikapáván během reakce 20 mmol hydrazin hydrát 80 %. Produkt byl po skončení reakční doby zfiltrován přes křemelinu, promyt  $2\times 5$  ml methanolu a filtrát byl vakuově zahuštěn. Přidáva byla  $\text{H}_2\text{O}$  a přikapávána 1M HCl až do pH 2. Produkt se extrahoval s dichlormethanem, vodná fáze se zneutralizovala 1M NaOH na pH 8 a byla vytřepána s ethylacetátem. Spojené organické fáze se vysušily bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrovaly na fritě a filtrát byl vakuově zahuštěn.

**TLC:**  $\text{CHCl}_3$ -MeOH v poměru 9:1

## 6-(4-Nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (6)



**Výtěžek:** 42 %

Žlutá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Mr** = 220,22

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 4,17 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,69 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 6,40 (d, *J*=9,0; 2H, ArH); 8,0 (d, *J*=9,0; 2H, ArH)

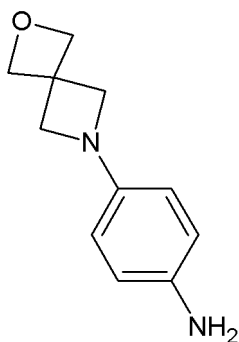
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 38,68; 60,86; 80,19; 110,27; 126,37; 136,94; 154,86

**HPLC-MS (ESI+):** 221,43 (99 %)

Do tlakové ampule byl převeden 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (0,01 mmol) (**3**), 4-nitro-1-fluorbenzen (0,01 mmol), uhličitan draselný (0,0115 mmol), přidáno bylo 15 ml bezvodého ethanolu a směs se míchá po dobu 2 hodin při 100 °C. Produkt vakuově zahuštěn, rozdělen mezi H<sub>2</sub>O (25 ml) a dichlormethan (25 ml). Vodná fáze byla ještě extrahována 2×25 ml dichlormethanem. Spojené organické fáze byly protřepány solankou a vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a následně přefiltrovány. Filtrát byl vakuově zahuštěn. Vzniklá žlutá krystalická látka krystalizovala s 30 ml ethylacetátu přes noc při -20 °C. Látka byla odňata a promyta 2×5 ml vychlazeného (0 °C) ethylacetátu.

**TLC:** hex-EtAc v poměru 1:1.

#### 4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)anilin (7)



**Výtěžek:** 94 %

Růžová krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O

**Mr** = 190,24

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 3,73 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,37 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 4,64 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 6,18 (d, *J*=8,5; 2H, ArH); 6,43 (d, *J*=8,5; 2H, ArH)

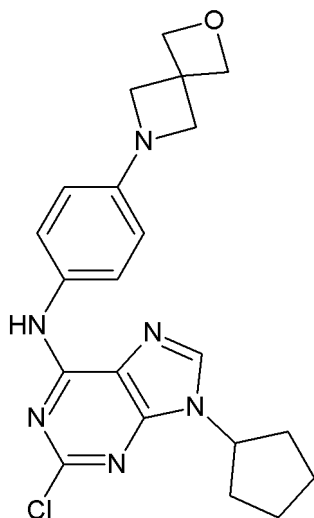
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 38,99; 62,04; 80,49; 113,30; 115,51; 140,93; 143,98

**HPLC-MS (ESI+):** 191,42 (96 %)

**Příprava:** palladium na aktivním uhlí (23,6 μmol) bylo převedeno do baňky s 20 ml methanolu, následně byl přidán 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (1,0 mmol) (**6**). Směs se míchá v baňce napojené na hydrogenační aparaturu při laboratorní teplotě až do teoretické vodíku. Po uplynutí reakční doby byla látka zfiltrována přes křemelinu a promyta malým množstvím methanolu. Poté byla vakuově zahuštěna, přičemž vzniká bílá krystalická látka, která na vzduchu růžoví.

**TLC:** hex-EtAc v poměru 1:1.

**N-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-amin (8)**



**Výtěžek:** 60 %

Nažloutlá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>6</sub>O

**Mr** = 410,89

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,71 – 1,84 (m, 2H); 1,86 – 1,97 (m, 4H); 2,14 – 2,17 (m, 2H); 3,95 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,71 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,78 (qui, *J*=7,02; 1H, CH); 6,44 (d, *J*=8,7; 2H, ArH); 7,53 (d, *J*=8,7; 2H, ArH); 8,34 (s, 1H, CH); 9,99 (s, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 24,04; 32,56; 38,88; 56,00; 61,90; 80,47; 112,09; 119,32; 123,60; 129,68; 140,81; 148,88; 149,026; 152,75; 153,15

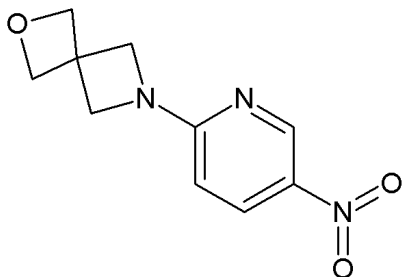
**HPLC-MS (ESI+):** 411,65 (97 %)

**Příprava:** Zde již byla provedena nukleofilní substituce do polohy C<sup>6</sup>. Směs 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)anilinu (0,74 mmol) (NB7), DIPEA (2,22 mmol) a 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu (0,74 mmol) v 2,5 ml *n*-propanolu byla v tlakové ampuli míchána a zahřívána po dobu 36 hodin při 120 °C. Po uplynutí reakční doby se po ochlazení na laboratorní teplotu vylučuje nažloutlá krystalická látka, která byla odňata na fritě a promyta 2×5 ml *n*-propanolu. Látka byla rozdělena mezi 20 ml dichlormethanu a 20 ml H<sub>2</sub>O. Vodná fáze byla ještě protřepána 2×20 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly protřepány solankou a vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následovala filtrace a filtrát byl vakuově zahuštěn.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1.



### 6-(5-Nitropyridin-2-yl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (9)



**Výtěžek:** 87 %

Žlutá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Mr** = 221,21

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 4,29 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,69 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 6,39 (d, J =9,5; 1H, ArH); 8,16 (dd, J=9,5; J'=3,0; 1H, ArH); 8,9 (d, J=3,0; 1H, ArH)

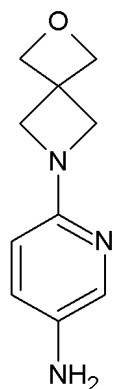
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 21,44; 38,56; 80,24; 105,21; 132,82; 146,99; 160,97

**HPLC-MS (ESI+):** 222,44 (100 %)

**Příprava:** 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (3,00 mmol) (**3**) byl převeden do tlakové ampule spolu s 2-bromo-5-nitropyridinem (3,00 mmol), uhličitánem draselným (3,06 mmol) a 5 ml ethanolu. Směs byla míchána a zahřívána při 100 °C po dobu 3 hodin. Reakční směs byla vakuově zahuštěna a rozdělena mezi 25 ml H<sub>2</sub>O a 25 ml dichlormetanu. Vodná fáze byla extrahována 2×25 ml dichlormethanu, spojené organické fáze byly protřepány solankou, vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zfiltrány. Filtrát byl vakuově zahuštěn a poté krystalizoval s 10 ml ethylacetátu při -20 °C přes noc. Výsledná žlutá krystalická látka byla přefiltrována přes fritu, promyta 2×2,5 ml vychlazeného (0 °C) ethylacetátu a ve vakuové sušárně se sušila do konstantní hmotnosti.

**TLC:** hex-EtAc v poměru 3:1.

**6-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)pyridin-3-amin (10)**



**Výtěžek:** 94 %

**Sumární vzorec:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O

**Mr** = 191,22

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 3,86 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,47 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 4,64 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 6,18 (d, *J*=8,0; 1H, ArH); 6,85 (dd, *J*=9,0; *J*'=3,0; 1H, ArH); 7,49 (d, *J*=3,0; 1H, ArH)

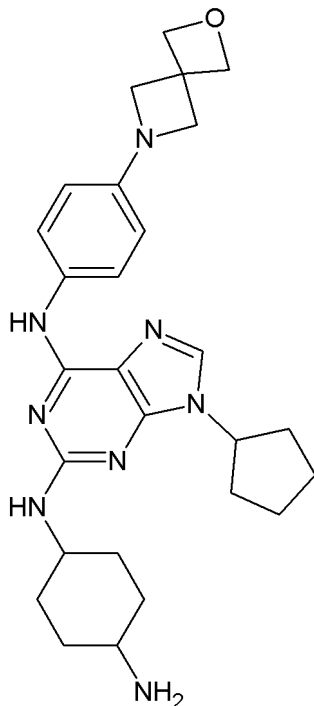
**HPLC-MS (ESI+):** 192,41 (92 %)

**Příprava:** Palladium na aktivním uhlí (0,09 mmol) bylo spolu se 40 ml methanolu převedeno do baňky. Poté byl přidán 6-(5-nitropyridin-2-yl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan (3,84 mmol) (**9**) a směs byla hydrogenována při laboratorné teplotě do teoretické spotřeby H<sub>2</sub>. Produkt byl zfiltrován na fritě přes křemelinu a filtrát vakuově zahuštěn.

**TLC:** hex-EtAc v poměru 3:1.

### 5.3 Syntéza cílových inhibitorů

**N<sup>6</sup>-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-N<sup>2</sup>-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin (12)**



**Výtěžek:** 67 %

**Sumární vzorec:** C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>8</sub>O

**Mr** = 488,62

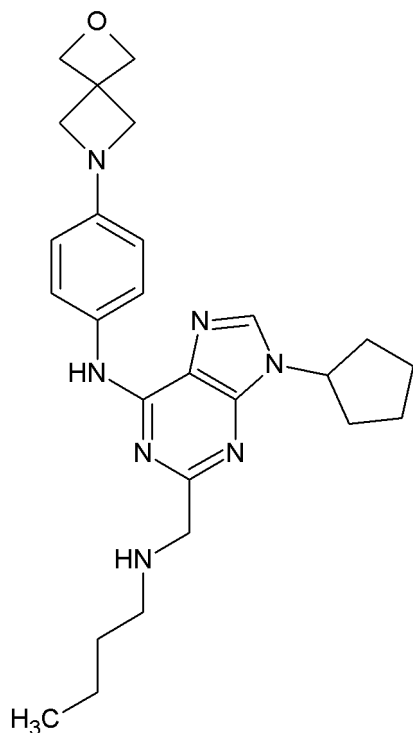
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,67 – 2,07 (s, 14H); 2,11 – 2,18 (m, 2H); 2,45- 2,5 (m, 4H); 4,71 – 4,74 (m, 4H); 3,92 – 3,94 (m, 4H), 4,83 (qui, *J*= 5,4; 1H); 4,48 (d, *J*=5,44; 1H); 6,48 (d, *J*=8,50; 2H); 7,55 (d, *J*=8,50; 2H); 8,32 (s, 1H); 9,95 (s, 1H)

**HPLC-MS (ESI+):** 489,65 (94 %)

**Příprava:** Prekurzor (**8**) (0,24 mmol) v 5 ml ethylenglykolu byl převeden do tlakové ampule a následně byl přidán trans-1,4-diaminocyklohexan (6,57 mmol). Směs byla zahřívána při 160 °C a míchána po dobu 200 minut. Po skončení reakční doby byla směs ochlazena. Látka byla rozdělena mezi 25 ml ethylacetátu a 20 ml H<sub>2</sub>O. Vodná fáze byla ještě protřepána 2×25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly protřepány solankou a vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následovala filtrace a filtrát byl vakuově zahuštěn. Surový produkt byl vyčištěn za pomoci kolonové chromatografie na sílice.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH v poměru 4:1:0,05.

**N<sup>6</sup>-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-N<sup>2</sup>-(4-aminobutyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin (13)**



**Výtěžek:** 65 %

Bílá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O

**Mr** = 462,59046

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,34 – 1,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,48 – 1,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,59 – 1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,78 -1,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,90 – 1,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,02 – 2,08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,53 (t, *J*= 7,0; H, CH<sub>2</sub>); 3,21 (q, *J*= 6,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,87 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,64 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 4,67 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 6,34 (d, *J*=8,5; 2H, ArH); 6,44 (t, *J*=5,0; 1H, NH); 7,71 (d, *J*=8,5; 2H, ArH); 7,80 (s, 1H, CH); 8,99(s(br) 1H, ArH)

Pozn. signál amino skupiny nebyl pozorován nebo zaniká v signálu H<sub>2</sub>O

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 24,24; 27,35; 29,60; 31,05; 32,32; 38,89; 41,84; 61,87; 80,57; 11,50; 112,0; 122,03 131,79; 136,74; 145,26; 147,58; 152,63; 159,43

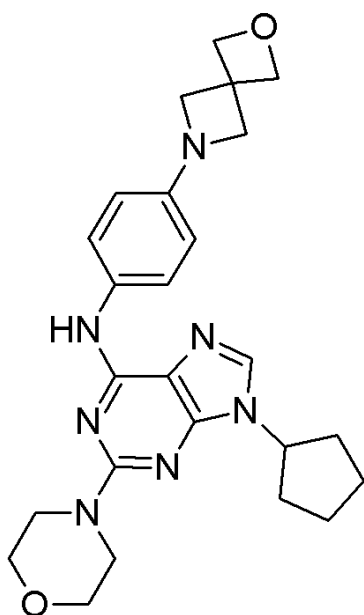
**HPLC-MS (ESI+):** 363,89 (93 %)

**Příprava:** Prekurzor (**8**) (0,24336 mmol) byl převeden spolu s DIPEA (0,24336 mmol) a putrescinem (4,867 mmol) do tlakové ampule. Směs byla míchána

a zahřívána při 130 °C po dobu 24 hodin. Po skončení reakční doby bylo k produktu přilito 20 ml H<sub>2</sub>O a látka se extrahovala 3×EtAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a filtrát byl vakuově zahuštěn. K odparku byl přidán dichlormethan a znovu vakuově zahuštěn.

**TLC:** hex-EtAc v poměru 2:1 nebo 1:1.

**N<sup>6</sup>-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-9-cyklopentyl-2-morfolin-9H-purin-6-amin (14)**



**Výtěžek:** 85 %

Bílá až nažloutlá krystalická látka

**Sumární vzorec:** C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>

**Mr** = 461,55934

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,59 – 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,79 – 1,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,90 – 1,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,05 – 2,11 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,57 – 3,80 (m, 8H, 4×CH<sub>2</sub>); 3,88 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,67 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 4,69 (qui, *J*=7,5; 1H CH); 6,38 (d, *J*=9,5; 2H, ArH); 7,59 (d, *J*=9,5; 2H, ArH) 7,90 (s, 1H, CH); 9,21 (s(br) 1H, NH)

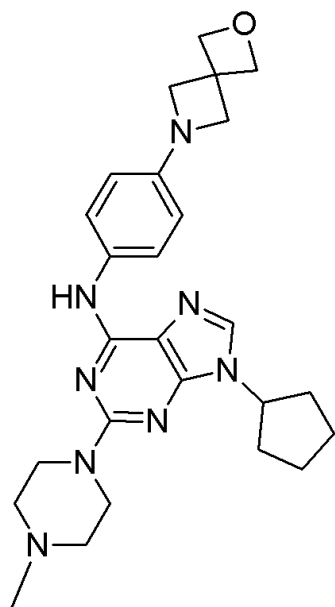
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 24,30; 32,31; 38,85; 45,48; 55,25; 61,85; 66,74; 80,48; 112,05; 114,62; 122,29; 131,03; 137,64; 147,94; 151,59; 152,46; 158,72

**HPLC-MS (ESI+):** 462,79 (94 %)

**Příprava:** Prekurzor (8) (0,24336 mmol) byl převeden spolu s DIPEA (0,24336 mmol) a morfolinem (4,579 mmol) do tlakové ampule. Směs byla míchána a zahřívána při 130 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení bylo k produktu přilito 20 ml H<sub>2</sub>O a látka se extrahovala 3×EtAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a filtrát byl vakuově zahuštěn. K odparku byl přidán dichlormethan a znovu vakuově zahuštěn.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH v poměru 4:1:0,05 nebo CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1

**N<sup>6</sup>-(4-(2-Oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-9-cyklopentyl-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-9H-purin-6-amin (15)**



**Výtěžek:** 66 %

**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>O

**Mr** = 474,60116

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,60 – 1,68 (m(2H, CH<sub>2</sub>)) ; 1,79 – 1,87 (m(2H, CH<sub>2</sub>)); 1,89 – 1,96 (m(2H, CH<sub>2</sub>)); 2,05 – 2,11 (m,2H, CH<sub>2</sub>); 2,18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,32 – 2,38 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>); 3,62 – 3,68 (m, 4h, 2×CH<sub>2</sub>); 3,88 (4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,67 (4H, 2×CH<sub>2</sub>); 4,68 (qui, *J*=7,5; 1H, CH); 6,37 (d, *J*=9,0; 2H, ArH); 7,58 (d, *J*=9,0; 2H, ArH) 7,89 (s(1H, CH); 9,17(s(br) 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 24,17; 32,45; 38,97; 44,61; 46,19; 56,30; 61,98; 79,71; 80,62; 111,89; 114,48; 122,24; 131,21; 137,50; 147,88; 151, 83; 152,29; 158,72

**HPLC-MS (ESI+):** 475,83 (98 %)

**Příprava:** Prekurzor (**8**) (0,24336 mmol) byl převeden spolu s DIPEA (0,24336 mmol) a *n*-methylpiperazinem (4,865 mmol) do tlakové ampule. Směs byla míchána a zahřívána při 130 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení bylo k produktu přilito 20 ml H<sub>2</sub>O a látka se extrahovala 3×EtAc. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrvány a filtrát byl vakuově zahuštěn.

**TLC:** CHCl<sub>3</sub>-MeOH v poměru 40:1

## 6. ZÁVĚR

Cílem práce byla syntéza vybraných nových inhibitorů FLT3 kinázy 2,6,9-trisubstituované purinové řady, které nesou ve vybraných pozicích heterospirocyclická jádra. Několikastupňovou syntézou byla připravena řada prekurzorů obsahující heterospirocyclické jádro, které se následně použily pro syntézu čtyř nových látek (**12**, **13**, **14** a **15**) jakožto potenciálních FLT3 inhibitorů. K přípravě některých prekurzorů a cílového inhibitoru **13** bylo využito více přístupů a jejich syntéza byla takto optimalizována.



## 7. POUŽITÁ LITERATURA

Abu-Duhier F., Goodeve A., Wilson G., Care R., Peake I. a Reilly J. (2001). Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* **113**, 983 – 988.

Agnès F., Shamoan B., Dina C., Rosnet O., Birnbaum D. a Galibert F. (1994) Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* **145**, 283 – 288.

Al-Kali A., Cortes J., Faderl S., Jones D., Abril C., Pierce S., Brandt M., Kantarjian H. a Ravandi F. (2011). Patterns of Molecular Response to and Relapse After Combination of Sorafenib, Idarubicin, and Cytarabine in Patients With FLT3 Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **11**, 361 – 366.

Ali A., Gale R. a Shakoori A. (2017). Detection of FLT3/TKD and IDH1 Mutations in Pakistani Acute Myeloid Leukemia Patients by Denaturing HPLC. *Journal of Cellular Biochemistry* **118**, 1174 – 1181.

Altman J., Sassano A. a Plataniotis L. (2011). Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget* **2**, 510 – 517.

Armstrong S., Kung A., Mabon M., Silverman L., Stam R., Den Boer M., Pieters R., Kersey J., Sallan S., Fletcher J., Golub T., Griffin J. a Korsmeyer S. (2003). Inhibition of FLT3 in MLL: Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* **3**, 173 – 183.

Assi R. a Ravandi F. (2018). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Choosing the best when the optimal does not exist. *American Journal of Hematology* **93**, 553 – 563.

Batchelor T., Gerstner E., Ye X., Desideri S., Duda D., Peereboom D., Lesser G., Chowdhary S., Wen P., Grossman S. a Supko J. (2017). Feasibility, phase I, and phase II

studies of tandutinib, an oral platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncology* **19**, 567 – 575.

Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R., Markova B., Carius B., Brecht A., Duyster J., Haferlach T., Huber C. a Fischer T. (2008). Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* **113**, 4074 – 4077.

Brown P. a Small D. (2004). FLT3 Inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. *European Journal of Cancer* **40**, 707 – 721.

Burkhard J. a Carreira E. (2008). 2,6-Diazaspiro[3.3]heptanes: Synthesis and Application in Pd-Catalyzed Aryl Amination Reactions. *Organic Letters* **10**, 3525 – 3526.

Burkhard J., Wagner B., Fischer H., Schuler F., Müller K. a Carreira E. (2010). Synthesis of Azaspirocycles and their Evaluation in Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 3524 – 3527.

Carreira E. a Fessard T. (2014). ChemInform Abstract: Four-Membered Ring-Containing Spirocycles: Synthetic Strategies and Opportunities. *ChemInform* **45**, 8257 – 8322.

Carow C., Kim E., Hawkins A., Webb H., Griffin C., Jabs E., Civin C. a Small D. (1995). Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q122--> q13. *Cytogenetic and Genome Research* **70**, 255 – 257.

Carow C., Levenstein M., Kaufmann H., Chen J., Amin S., Rockwell .P, Witte L., Borowitz J., Civin I., Small D. (1996) Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* **87**. 1089 – 1096.

Chen X., Gao F., Wang Q., Huang X. a Wang, D. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of paclitaxel-mimics possessing only the oxetane D-ring and side chain structures. *Fitoterapia* **92**, 111 – 115.

Choi E., Lee J., Lee J., Park H., Ko S., Hur E., Moon J., Goo B., Kim Y., Seol M., Lee Y., Kang Y., Jeon M., Woo J. a Lee K. (2018). Comparison of anthracyclines used for

induction chemotherapy in patients with FLT3 -ITD-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* **68**, 51 – 56.

Chow P., Gandhi M., Tan S., Khin M., Khasbazar A., Ong J., Choo S., Cheow P., Chotipanich C., Lim K., Lesmana L., Manuaba T., Yoong B., Raj A., Law C., Cua I., Lobo R., Teh C., Kim Y., Jong Y., Han H., Bae S., Yoon H., Lee R., Hung C., Peng C., Liang P., Bartlett A., Kok K., Thng C., Low A., Goh A., Tay K., Lo R., Goh B., Ng D., Lekurwale, G., Liew W., GebSKI V., Mak K. a Soo K. (2018). SIRveNIB: Selective Internal Radiation Therapy Versus Sorafenib in Asia-Pacific Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 76.089.

ClinicalTrials.gov. (QuANTUM-R): an open-label study of quizartinib monotherapy vs salvage chemotherapy in acute myeloid leukemia (AML) subjects who are FLT3-ITD positive <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02039726> (Vydáno 20. ledna 2014).

ClinicalTrials.gov. First-in-Human Study of FLX925 in Subjects With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02335814> (Vydáno 12. února 2015).

ClinicalTrials.gov. Quizartinib with standard of care chemotherapy and as maintenance therapy in patients with newly diagnosed FLT3-ITD (+) acute myeloid leukemia (AML) (QuANTUM-First) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02668653> (Vydáno 29. ledna 2016).

Cortes J., Perl A., Dombret H., Kayser S., Steffen B., Rousselot P., Martinelli G., Estey E., Burnett A., Gammon G., Trone D., Leo E., a Levis M. (2012). Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients  $\geq$  60 Years of Age with FLT3 ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **120**, 48.

Cortes J., Tallman M., Schiller G., Trone D., Gammon G., Goldberg S., Perl A., Marie J. a Martinelli G. (2013). Results Of a Phase 2 Randomized, Open-Label, Study Of Lower Doses Of Quizartinib (AC220; ASP2689) In Subjects With FLT3-ITD Positive Relapsed Or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* **122**, 494.

Demetri G., van Oosterom A., Garrett C., Blackstein M., Shah M., Verweij J., McArthur G., Judson I., Heinrich M., Morgan J., Desai J., Fletcher C., George S., Bello C., Huang X., Baum C. a Casali P. (2006). Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *The Lancet* **368**, 1329 – 1338.

Duncton M., Estiarte M., Tan D., Kaub C., O'Mahony D., Johnson R., Cox M., Edwards W., Wan M., Kincaid J. a Kelly, M. (2008). Preparation of Aryloxetanes and Arylazetidines by Use of an Alkyl–Aryl Suzuki Coupling. *Organic Letters* **10**, 3259 – 3262.

Dosil M., Wang S. a Lemischka I. (1993). Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 6572 – 6585.

Ebihara Y., Tsuji K., Lyman D., Sui X., Yoshida M., Muraoka K., Yamada K., Tanaka R., a Nakahata T. (1997). Synergistic action of Flt3 and gp130 signalings in human hematopoiesis. *Blood* **90**, 4363 – 4368.

El Fakih R., Rasheed W., Hawsawi Y., Alsermani M. a Hassanein M. (2018). Targeting FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **7**, 4.

Fiedler W., Serve H., Döhner H., Schwittay M., Ottmann O., O'Farrell M., Bello L., Allred R., Manning C., Cherrington M., Louie G., Hong W., Brega M., Massimini G., Scigalla P., Berdel E. a Hossfeld K. (2004). A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* **105**, 986 – 993.

Fiedler W., Kayser S., Kebenko M., Janning M., Krauter J., Schittenhelm M., Götze K., Weber D., Göhring G., Teleanu V., Thol F., Heuser M., Döhner K., Ganser A., Döhner H. a Schlenk, R. (2015). A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *British Journal of Haematology* **169**, 694 – 700.

Fischer T., Stone R., DeAngelo D., Galinsky I., Estey E., Lanza C., Fox E., Ehninger G., Feldman E., Schiller G., Klimek V., Nimer S., Gilliland D., Dutreix C., Huntsman-Labeled A., Virkus J. a Giles F. (2010). Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients With Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome With Either Wild-Type or Mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 4339 – 4345.

Fujimoto J., Hirayama T., Hirata Y., Hikichi Y., Murai S., Hasegawa M., Hasegawa Y., Yonemori K., Hata A., Aoyama K. a Cary, D. (2017). Studies of CDK 8/19 inhibitors: Discovery of novel and selective CDK8/19 dual inhibitors and elimination of their CYP3A4 time-dependent inhibition potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **25**, 3018 – 3033.

Gadekar P., Roychowdhury A., Kharkar P., Khedkar V., Arkile M., Manek H., Sarkar D., Sharma R., Vijayakumar V. a Sarveswari, S. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of novel azaspiro analogs of linezolid as antibacterial and antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **122**, 475 – 487.

Galanis A., Ma H., Rajkhowa T., Ramachandran A., Small D., Cortes J. a Levis M. (2014). Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood* **123**, 94 – 100.

Gianfelici V., Diverio D., Breccia M., Buffolino S., Derm, V., Di Lascio A., Marinelli M., Santangelo S., Meloni G. a Foà, R. (2010). A novel point mutation within the juxtamembrane domain of the *flt3* gene in acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology* **90**, 845 – 846.

Gilliland D. (2002). Molecular genetics of human leukemias: New insights into therapy. *Seminars in Hematology* **39**, 6 – 11.

Gilliland D., Jordan C. a Felix C. (2004). The Molecular Basis of Leukemia. *Hematology* **2004**, 80 – 97.

Golden M., Legg D., Milne D., Bharadwaj A., Deepthi K., Gopal M., Dokka N., Nambiar S., Ramachandra P., Santhosh U., Sharma P., Sridharan R., Suler M., Linderberg M.,

Nilsson A., Sohlberg R., Kremers J., Oliver S. a Patra, D. (2016). The Development of a Manufacturing Route to an MCHr1 Antagonist. *Organic Process Research & Development* **20**, 675 – 682.

Griffith J., Black J., Faerman C., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J., Saxena K. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell* **13**, 169 – 178.

Grimwade D., Hills R., Moorman A., Walker H., Chatters S., Goldstone A., Wheatley K., Harrison C. a Burnett A. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354 – 365.

Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V. a Kryštof V. (2018). Discovery of N2-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Mutations. *Journal of Medicinal Chemistry*.

Gunatilaka A., Ramdayal F., Sarragiotto M., Kingston D., Sackett D. a Hamel E. (1999). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Paclitaxel (Taxol) D-Ring Modified Analogues. *The Journal of Organic Chemistry* **64**, 2694 – 2703.

Gurry M., McArdle P. a Aldabbagh F. (2015). Synthesis of a Spirocyclic Oxetane-Fused Benzimidazole. *Molecules* **20**, 13864 – 13874.

Hayakawa F., Towatari M., Kiyoi H., Tanimoto M., Kitamura T., Saito H. a Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* **19**, 624 – 631.

Huang J., Yokoyama R., Yang C. a Fukuyama, Y. (2000). ChemInform Abstract: Merrilactone A, a Novel Neurotrophic Sesquiterpene Dilactone from *Illicium merrillianum*. *ChemInform* **31**, 6111 – 6114.

Hubbard S. (2001). Theme and Variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. *Molecular Cell* **8**, 481 - 482.

Indio V., Astolfi A., Tarantino G., Urbini M., Patterson J., Nannini M., Saponara M., Gatto L., Santini D., do Valle I., Castellani G., Remondini D., Fiorentino M., von Mehren M., Brandi G., Biasco G., Heinrich M. a Pantaleo, M. (2018). Integrated Molecular Characterization of Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) Harboring the Rare D842V Mutation in PDGFRA Gene. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 732.

Inoue M., Sato T. a Hiramama M. (2006) Asymmetric Total Synthesis of (-)-Merrilactone A (I): Use of a Bulky Protecting Group as Long-Range Stereocontrolling Element. (2006). *ChemInform* **37**, 4843 - 4848.

Irons D. a Stillman S. (1996). The proces of leukemogenesis. *Environ Health Perspect* **104**, 1239 – 1246.

Jiang J., Paez G., Lee C., Bo R., Stone M., DeAngelo J., Galinsky I., Wolpin M., Jonasova A., Herman P., Fox A., Boggon J., Eck J., Weisberg E., Griffin D., Gilliland G., Meyerson M. a Sellers R. (2004). Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* **104**, 1855 – 1858.

Kadia M., Ravandi F., Cortes J. a Kantarjan H. (2016). New grugs in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol* **27**, 770 – 778.

Kasi P., Litzow M., Patnaik M., Hashmi S. a Gangat, N. (2016). Clonal evolution of AML on novel FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor therapy with evolving actionable targets. *Leukemia Research Reports* **5**, 7 – 10.

Kaufman B. (2017) Pharmaceutival Approval Update. *A peer-Reviewed Journal for Manged Care and Hospital Formulary Management* **42**, 620 – 621.

Kelly L., Yu J., Boulton C., Apatira M., Li J., Sullivan C., Williams I., Amaral S., Curley D., Duclos N., Neuberg D., Scarborough R., Pandey A., Hollenbach S., Abe K., Lokker N., Gilliland D. a Giese, N. (2002). CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* **1**, 421 – 432.

Kim K., Levis M. a Small, D. (2006). Constitutively activated FLT3 phosphorylates BAD partially through Pim-1. *British Journal of Haematology* **134**, 500 – 509.

Kim E. (2017). Midostaurin: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1251 – 1259.

Knapper S., Burnett A., Littlewood T., Kell W., Agrawal S., Chopra R., Clark R., Levis M. a Small, D. (2006). A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood* **108**, 3262 – 3270.

Knapper S., Russell N., Gilkes A., Hills R., Gale R., Cavenagh J., Jones G., Kjeldsen L., Grunwald M., Thomas I., Konig H., Levis M. a Burnett, A. (2017). A randomized assessment of adding the kinase inhibitor lestaurtinib to first-line chemotherapy for FLT3-mutated AML. *Blood* **129**, 1143 – 1154.

Kokonozaki M., Tsirakis G., Devetzoglou M., Kyriakaki S., Antonakis A., Vyzoukaki R., Pappa C., Tzardi M. a Alexandrakis M. (2015). Potential role of FLT3-ligand in the angiogenic process of multiple myeloma. *Leukemia Research* **39**, 1467 – 1472.

Kottaridis D., Gale E., Linch C. (2003). FLT3 mutations and leukaemia. *Br J Hematol* **122**, 523 – 38.

Ledesma A., Zinczuk J., López González J., Ben Altabef A. a Brandán S. (2009). Structural, vibrational spectra and normal coordinate analysis for two tautomers of 4(5)-(2'-furyl)-imidazole. *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 587 – 597.

Lee L., Hernandez D., Rajkhowa T., Smith S., Raman J., Nguyen B., Small D. a Levis M. (2017). Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood* **129**, 257 – 260.

Levis M. a Small D. (2003). FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia* **17**, 1738 – 1752.

Levis M. (2014). Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia. *Future Oncology* **10**, 1571 – 1579.



Li Y. a Xu W. (2017). Efficacy and safety of linezolid compared with other treatments for skin and soft tissue infections: a meta-analysis. *Bioscience Reports* **38**, BSR20171125.

Lindblad O., Cordero E., Puissant A., Macaulay L., Ramos A., Kabir N., Sun J., Vallon-Christersson J., Haraldsson K., Hemann M., Borg Å., Levander F., Stegmaier K., Pietras K., Rönstrand L. a Kazi, J. (2016). Aberrant activation of the PI3K/mTOR pathway promotes resistance to sorafenib in AML. *Oncogene* **35**, 5119 – 5131.

Loh J., Carlson R., York W. a Stacey G. (2002). Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 14446 – 14451.

Luger P. a Buschmann J. (1984). Oxetane: the first x-ray analysis of a nonsubstituted four-membered ring. *Journal of the American Chemical Society* **106**, 7118 – 7121.

Lyman D., James L., Vanden Bos T., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth T., Picha S., McKenna J. a Splett R. (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine Kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* **75**, 1157 – 1166.

Lyman D., James L., Johnson L., Brasel K., de Vries P., Escobar S., Downey H., Splett R., Beckmann P. a McKenna J. (1994). Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* **10**, 2795 – 801.

Lyman D. a Jacobsen E. (1998). C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* **4**, 1101 – 1134.

Mansur M., Ford A. a Emerenciano M. (2017). The role of RAS mutations in MLL - rearranged leukaemia: A path to intervention?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1868**, 521 – 526.

Markovic A., MacKenzie L. a Lock B. (2005). FLT-3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* **6**, 1168 – 1172.

Martelli M., Evangelisti C., Chiarini F. a McCubrey A. (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* **1**, 89 – 103.

Marubayashi S., Park A., Noubade R., Phan H., Cutler G., Kassner P., a Fridman S. (2016). FLX925 Is a Rationally Designed FLT3, CDK4/6 Inhibitor with a Desirable Resistance Profile. *Blood* **128**, 2323.

McKillop D., McCormick D., Miles S., Phillips J., Pickup J., Bushby N. a Hutchison M. (2004) In vitro metabolism of gefitinib in human liver microsomes. *Xenobiotica* **34**, 983 – 1000.

Meanwell N. (2011). Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 2529 – 2591.

Meshinchi S. a Appelbaum, F. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* **15**, 4263 – 4269.

Mills K., Gilkes A., Walsh V., Sweeney M. a Gale R. (2005). Rapid and sensitive detection of internal tandem duplication and activating loop mutations of FLT3. *British Journal of Haematology* **130**, 203 – 208.

Mizuki M., Fenski R., Halfter H., Matsumura I., Schmidt R., Müller C., Grüning W., Kratz-Albers K., Serve S., Steur C., Büchner T., Kienast J., Kanakura Y., Berdel E. a Serve H. (2000). Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* **96**, 3907 – 3914.

Motyckova G. a Stone R. (2010). The Role of Molecular Tests in Acute Myelogenous Leukemia Treatment Decisions. *Current Hematologic Malignancy Reports* **5**, 109 – 117.

Mrozek K., Marcucci G., Paschka P., Whitman S. and Bloomfield C. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?. *Blood* **109**, 431 – 448.

Omura S., Murata M., Imamura N., Iwai Y., Tanaka H., Furusaki A. a Matsumoto H. (1984) Oxetin, a new antimetabolite from an actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **37**, 1324 – 1332.

Ozeki, K., Kiyoi H., Hirose Y., Iwai M., Ninomiya M., Koderu Y., Miyawaki S., Kuriyama K., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Ueda R., Ohno R., Emi N. a Naoe T. (2004). Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* **103**, 1901 – 1908.

Parigi S., Czarnewski P., Das S., Steeg C., Brockmann L., Fernandez-Gaitero S., Yman V., Forkel M., Höög C., Mjösberg J., Westerberg L., Färnert A., Huber S., Jacobs T. a

Patnaik M. (2017). The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 1 – 14.

Piacibello W., Fubini L., Sanavio F., Brizzi F., Severino A., Garetto L., Stacchini A., Pegoraro L. a Aglietta M. (1995) Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* **46**, 4105 – 4114.

Pratz K., Sato T., Murphy K., Stine A., Rajkhowa T. a Levis, M. (2010). FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood* **115**, 1425 – 1432.

Propper D., McDonald A., Man A., Thavasu P., Balkwill F., Braybrook J., Caponigro F., Graf P., Dutreix C., Blackie R., Kaye S., Ganesan T., Talbot D., Harris A. a Twelves C. (2001). Phase I and Pharmacokinetic Study of PKC412, an Inhibitor of Protein Kinase C. *Journal of Clinical Oncology* **19**, 1485 – 1492.

Rosnet O., Schiff C., Pebusque M. (1993). Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* **82**, 1110 – 1119.

Scheijen B., Ngo H., Kang H. a Griffin J. (2004). FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene* **23**, 3338 – 3349.

Schnittger S., Schoch C., Dugas M., Kern W., Staib P., Wuchter C., Löffler H., Sauerland M., Serve H., Büchner T., Haferlach T. a Hiddemann W. (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, **100**, 59 – 66.

Scholl S., Krause C., Loncarevic I., Müller R., Kunert C., Wedding U., Sayer H., Clement J. a Höffken, K. (2005). Specific detection of Flt3 point mutations by highly sensitive real-time polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **145**, 295 – 304.

Searles S. a Tamres M. (1951). Hydrogen Bond Formation with Saturated Cyclic Ethers<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **73**, 3704 – 3706.

Shimada N., Hasegawa S., Harada T., Tomisawa T., Fujii A. a Takita T. (1986). Oxetanocin, a novel nucleoside from bacteria. *The Journal of Antibiotics* **39**, 1623 – 1625.

Smith B., Levis M., Beran M., Giles F., Kantarjian H., Berg K., Murphy M., Dausers T., Allebach J. a Small D. (2004). Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **103**, 3669 – 3676.

Smith C., Wang Q., Chin C., Salerno S., Damon L., Levis M., Perl A., Travers K., Wang S., Hunt J., Zarrinkar P., Schadt E., Kasarskis A., Kuriyan J. a Shah N. (2012). Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature* **485**, 260 – 263.

Smith C., Lasater E., Lin K., Wang Q., McCreery M., Stewart W., Damon L., Perl A., Jeschke G., Sugita M., Carroll M., Kogan S., Kuriyan J. a Shah, N. (2014). Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 5319 – 5324.

Steiner N., Hajek R., Sevcikova S., Borjan B., Jöhrer K., Göbel G., Untergasser G. a Gunsilius E. (2017). High levels of FLT3-ligand in bone marrow and peripheral blood of patients with advanced multiple myeloma. *PLOS ONE* **12**, 0181487.

Stone M., DeAngelo J., Klimek V., Galinsky I., Estey E., Nimer D., Grandin W., Lebowitz D., Wang Y., Cohen P., Fox A., Neuberg D., Clark J., Gilliland G. a Griffin D. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* **105**, 54 – 60.

Stone M., Mandrekar J., Sanford L., Laumann K., Geyer S., Bloomfield D., Thiede C., Prior W., Döhner K., Marcucci G., Lo-Coco F., Klisovic B., Wei A., Sierra J., Sanz A., Brandwein M., de Witte T., Niederwieser D., Appelbaum R., Medeiros C., Tallman S., Krauter J., Schlenk F., Ganser A., Serve H., Ehninger G., Amadori S., Larson A. a Döhner H. (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England journal of medicine* **377**, 454 – 464.

Tannir N., Figlin R., Gore M., Michaelson M., Motzer R., Porta C., Rini B., Hoang C., Lin X. a Escudier B. (2018). Long-Term Response to Sunitinib Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Pooled Analysis of Clinical Trials. *Clinical Genitourinary Cancer* **16**, 6 – 12.

Tsapogas P., Mooney C., Brown G. a Rolink A. (2017). The Cytokine Flt3-Ligand in Normal and Malignant Hematopoiesis. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1115.

Villablanca E. (2018). Flt3 ligand expands bona fide innate lymphoid cell precursors in vivo. *Scientific Reports*, **8**.

Wang S., Yang C., Sánchez-Murcia P., Snyder J., Yan N., Sáez-Calvo G., Díaz J., Gago F. a Fang W. (2015). Restoration of Microtubule Interaction and Cytotoxicity in D-seco Taxanes upon Incorporation of 20-Hydroxymethyl-4-allyloxy Groups. *Organic Letters* **17**, 6098 – 6101.

Wani C., Taylor L., Wall E., Coggon P. a McPhail T. (1971) Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 2325 – 2327.

Weisberg E., Boulton C., Kelly L., Manley P., Fabbro D., Meyer T., Gilliland D. a Griffin J. (2002). Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* **1**, 433 – 443.

Weisberg E., Sattler M., Manley W. a Griffin D. (2018) Spotlight on midostaurin in the treatment of FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis: design, development, and potential place in therapy. *Onco Targets Ther.* **11**, 175 – 182.

Wilhelm S., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L., Bollag G. a Trail, P. (2004). BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Research* **64**, 7099 – 7109.

Williams C., Kambhampati S., Fiskus W., Wick J., Dutreix C., Ganguly S., Aljitawi O., Reyes R., Fleming A., Abhyankar S., Bhalla K. a McGuirk J. (2013). Preclinical and Phase I Results of Decitabine in Combination with Midostaurin (PKC412) for Newly Diagnosed Elderly or Relapsed/Refractory Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **33**, 1341 – 1352.

Wishka D., Walker D., Beagley P., Lyon J. a Farley, K. (2011). A Concise Synthesis of 6-Oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptane Hydrotosylate. *Synthesis* **16**, 2619 – 2624.

Wuitschik G., Rogers-Evans M., Müller K., Fischer H., Wagner B., Schuler F., Polonchuk L. a Carreira E. (2006). Oxetanes as Promising Modules in Drug Discovery. *Angewandte Chemie* **118**, 7736 – 7739.

Wuitschik G., Rogers-Evans M., Buckl A., Bernasconi M., Märki M., Godel T., Fischer H., Wagner B., Parrilla I., Schuler F., Schneider J., Alker A., Schweizer W., Müller K. a

Carreira E. (2008). Inntitelbild: Spirocyclic Oxetanes: Synthesis and Properties. *Angewandte Chemie* **120**, 4512 – 4515.

Wuitschik G., Carreira E., Wagner B., Fischer H., Parrilla I., Schuler F., Rogers-Evans M. a Müller, K. (2010). Oxetanes in Drug Discovery: Structural and Synthetic Insights. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 3227 – 3246.

Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R. a Naoe T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**, 2434 – 2439.

Yang J. a Hung M. (2009). A New Fork for Clinical Application: Targeting Forkhead Transcription Factors in Cancer. *Clinical Cancer Research* **15**, 752 – 757.

Yonemura Y., Ku H., Lyman S. a Ogawa M. (1997). In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood* **89**, 1915 – 1921.

Zarrinkar P., Gunawardane R., Cramer M., Gardner M., Brigham D., Belli B., Karaman M., Pratz K., Pallares G., Chao Q., Sprankle K., Patel H., Levis M., Armstrong R., James J. a Bhagwat S. (2009). AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **114**, 2984 – 2992.

Zhang S., Mantel C. a Broxmeyer H. (1999). Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *Journal of Leukocyte Biology* **65**, 372 – 380.

Zhang S. a Broxmeyer H. (2000). Flt3 Ligand Induces Tyrosine Phosphorylation of Gab1 and Gab2 and Their Association with Shp-2, Grb2, and PI3 Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **277**, 195 – 199.

Zhang W., Konopleva M., Shi Y., McQueen T., Harris D., Ling X., Estrov Z., Quintás-Cardama A., Small D., Cortes J. a Andreeff, M. (2008). Mutant FLT3: A Direct Target of

Sorafenib in Acute Myelogenous Leukemia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **100**, 184 – 198.

Zhao F., Lin Z., Wang F., Zhao W. a Dong, X. (2013). Four-membered heterocycles-containing 4-anilino-quinazoline derivatives as epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**, 5385 – 5388.

Zheng N., Zhao C., He X., Jiang S., Han S., Xu G. a Li P. (2016). Simultaneous determination of gefitinib and its major metabolites in mouse plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetics study. *Journal of Chromatography B* **1011**, 215 – 222.

Zorn J., Wang Q., Fujimura E., Barros T. a Kuriyan, J. (2015). Crystal Structure of the FLT3 Kinase Domain Bound to the Inhibitor Quizartinib (AC220). *PLOS ONE* **10**, 0121177.