

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta  
Katedra organické chemie



**Studium syntézy vybraných konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných  
derivátů purinu s polyaminy**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Kristýna Hanáková</b>
Studijní program:	B1407 Bioorganická chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.</b>
Rok:	2014

**Prohlášení:**

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

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

Děkuji RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, vstřícnost a odborné vedení v průběhu příprav a zpracování předkládané bakalářské práce. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, zejména RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. za podnětné rady a připomínky při provedení experimentální části práce.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Kristýna Hanáková

Název práce: Studium syntézy vybraných konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s polyaminy

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Laboratoř růstových regulátorů

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt: Práce je zaměřena na syntézu látek 2,6,9-trisubstituované purinové řady jako prekurzorů pro konjugaci s polyaminy. V teoretické části je provedena literární rešerše strukturních typů CDK inhibitorů, jejich selektivity a biologických účinků. Dále jsou rozebrány možnosti cíleného směřování chemoterapeutik včetně využití polyaminového transportního systému. Experimentální část zahrnuje mnohastupňovou syntézu purinových derivátů, polyaminů a konjugátů.

Klíčová slova: cyklin-dependentní kinázy, inhibitory cyklin-dependentních kináz, roskovitin, bioisostery, polyaminový transportní systém, antiproliferativní účinky, protinádorové účinky, polyaminy, cílený transport

Počet stran: 61

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name

and surname: Kristýna Hanáková

Title: Study of the synthesis of selected conjugates of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with polyamines

Type of thesis: Bachelor

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: 2014

Abstract: This work focuses on the synthesis of substances 2,6,9-tri-purine series as precursors for conjugation with polyamines. The theoretical part is a literature review of structural types of CDK inhibitors, their selectivity and biological effects. There are also analyzed the possibility of directing targeted chemotherapeutics including the use of the polyamine transport system. Experimental part involves multistep synthesis of purine derivatives, polyamines and conjugates.

Keywords: cyclin dependent kinases, inhibitors of cyclin-dependent kinases, roscovitine, bioisosteres, polyamine transport system, antiproliferative effects, antitumor effects, polyamines, targeted transport

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language: Czech

## Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Teoretická část	9
3.1. Inhibitory cyklin-dependentních kináz	9
3.1.1. Význam cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu	9
3.1.2. Inhibitory CDK, strukurní typy, selektivita, terapeutický potenciál	11
3.2. Cíleně směřovaná protinádorová léčiva	19
3.2.1. Stručný přehled možností cíleného směřování	20
3.2.2. Cílené směřování s využitím polyaminů - koncept, příklady	26
3.2.3. Možnosti využití polyaminů pro směřování 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu, design konjugátů s ohledem na znalost vazebného místa v CDK2	30
3.2.4. Potenciál studia biologické aktivity navržených konjugátů	31
4. Dosažené výsledky	33
4.1. Syntéza prekurzorů	35
4.2. Syntéza konjugátů	36
5. Experimentální část	37
5.1. Materiál a metody	37
5.2. Syntéza prekurzorů	37
5.2.1. Syntéza 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)-methyl]-benzoové kyseliny	37
5.2.2. Syntéza 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino)-methyl]-benzoyl chloridu	39
5.2.3. Syntéza 5-(5-[2-(4-tert-Butoxykarbonylamino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino]-methyl)-pyridin-2-yl)-thiofen-2-karboxylové kyseliny	40
5.2.4. Syntéza polyaminů	45
5.3. Syntéza konjugátů	49
6. Závěr	53
7. Použitá literatura	54
8. Seznam použitých zkratk	61

## 1. Úvod

Cyklin-dependentní kinázy jsou specifické proteinkinázy, jež jsou nezbytnými faktory pro regulaci buněčného cyklu (Malumbres a Barbacid, 2005). Nekontrolovatelná buněčná proliferace nádorových buněk je často spojována s narušením aktivity cyklin-dependentních kináz, nadměrnou expresí cyklinů a vlivem mutací genů kódujících regulační proteiny podílející se na tomto ději (Malumbres *et al.*, 2004; Lapenna a Giordano, 2009; Smalley *et al.*, 2008). Na základě těchto skutečností byla vědecká činnost zaměřena na vývoj účinných inhibitorů cyklin-dependentních kináz.

Mezi první dvě generace inhibitorů, jež byly zařazeny do klinického testování, patří flavopiridol a roskovitin (Blagosklonny, 2004; Meijer *et al.*, 2006). *R*-enantiomer roskovitinu, derivát 2,6,9-trisubstituované purinové řady, se stal perspektivním inhibitorem pro terapii rakoviny plic, nosohltanu a jiných maligních onemocnění (Hsieh *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010). Optimalizace roskovitinové struktury vedla k objevu mnoha dalších účinných látek jako je například inhibitor pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinové struktury - dinaciclib (Parry *et al.*, 2010).

Přestože již více než dvacet látek s inhibiční aktivitou bylo zařazeno do klinických studií, žádná z nich nebyla z důvodu přítomnosti nežádoucích účinků schválena (Tong *et al.*, 2010; Massard *et al.*, 2011). Dalším negativním faktorem při léčbě rakoviny je nízká specifita nádorových buněk vůči chemoterapeutiku. Nadějným přístupem, jak tuto specifitu zvýšit, je konjugace chemoterapeutika (inhibitoru) s látkou selektivní vůči nádorovým buňkám. To může být zprostředkováno cíleným transportem s využitím polyaminů jako přenašečů anti-karcinogenní látky do nádorových buněk. (Palmer *et al.*, 2010). Cílem je tedy připravit takovou látku, která by blokovala buněčný cyklus, způsobovala apoptózu a byla selektivní vůči nádorovým buňkám.

## **2. Cíl práce**

Cílem práce je syntéza konjugátů vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz 2,6,9-trisubstituované purinové řady s polyaminy jako směrovaných látek pro polyaminový transportní systém. Práce zahrnuje mnohastupňovou syntézu navržených konjugátů včetně prekurzorů polyaminů, studium jejich struktury základními metodami organické strukturní analýzy a navržení případných dalších možností práce na tomto poli.



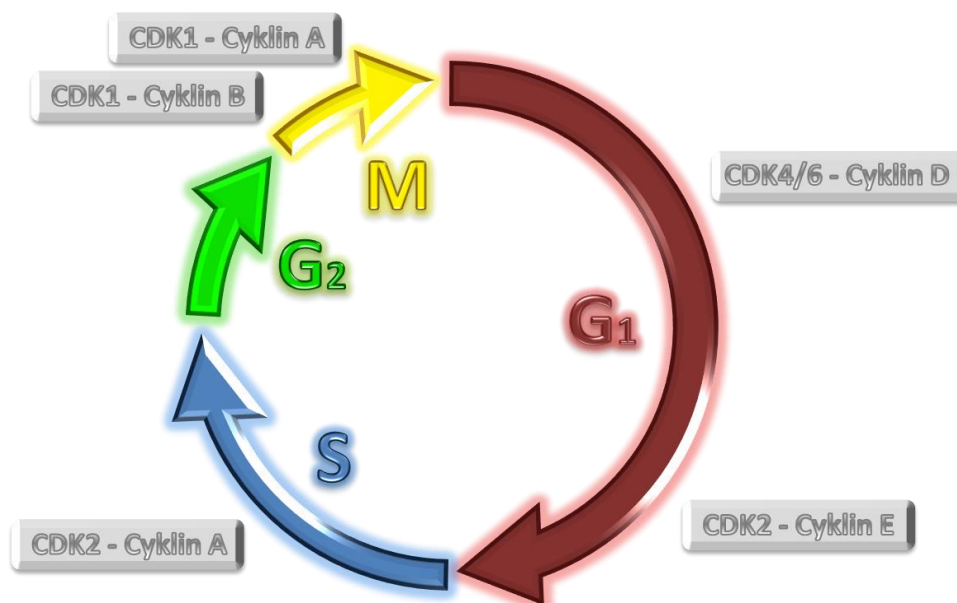
### 3. Teoretická část

#### 3.1 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

##### 3.1.1 Význam cyklin-dependentních kináz v buněčném cyklu

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) hrají stěžejní roli v procesu buněčného cyklu. Jsou aktivovány specifickým způsobem pomocí cyklinů, přičemž vzniká aktivní komplex katalyzující přenos fosfátové skupiny z ATP na serinové či threoninové zbytky cílových proteinů zahrnujících transkripční regulátory. Tyto proteiny pak následně ovlivňují specifické fáze genové exprese, stimulují DNA replikaci a iniciují mitózu (Malumbres a Barbacid, 2005).

Při dělení buněk mateřských na dceřiné procházejí somatické buňky několika fázemi. Jedná se konkrétně o čtyři fáze: G1, S, M a G2. Je nutno zmínit také existenci specifického období G0 fáze, kdy se buňka dále již nedělí. Přejít z G0/G1 je řízen přítomností komplexu CDK3 - cyklin C. Tento komplex zprostředkovává stimulaci a fosforylaci retinoblastoma proteinu (Rb). Mitogenní signály indukují transkripční faktory na buňky v G0 fázi, které pak mohou vstoupit do G1 fáze. G1 fáze je regulována komplexy tvořenými katalytickými podjednotkami CDK4/CDK6 spolu s regulační podjednotkou cyklinem D, jež fosforyluje Rb vázaný s transkripčními faktory E2F/DP. Dále se na této fázi podílí cyklin C spolu s CDK8. Následující období, tj. období S-fáze (též syntetické fáze), je kontrolováno cyklinem A spolu s CDK2, která bývá uvolněna z interakce s cyklinem E po G1/S přechodu. Při S-fázi dochází k disociaci Rb a E2F/DP a je vyvolán pozitivní signál pro syntézu DNA. Mezi mitotické cykliny řadíme cykliny A a B, které působí ve spojení s CDK1. Tyto komplexy jsou nezbytnými faktory při tvorbě mitotického aparátu (Bártek *et al.*, 1996; Sherr, 2000; Sridhar *et al.*, 2006).



Obr. 1: Význam CDK v buněčném cyklu.

Mimo výše uvedené typy CDK existuje mnoho dalších jako např. CDK5, jejíž aktivita je omezena na nervový systém. Tato protein-kináza je výjimečná také tím, že není závislá na vazbě s cyklinem, ale pro její aktivní fungování je nezbytná asociace s proteiny p35 nebo p39. CDK7 se váže na cyklin H, podílí se na aktivitě dalších CDK vstupujících do buněčného cyklu a spolu s CDK8 a CDK9 zastává regulační funkce při transkripci. CDK10 interaguje s transkripčním faktorem Ets2 a CDK11 působí s cyklinem L při apoptóze. (Knockaert *et al.*, 2002; Sridhar *et al.*, 2006).

Regulační děje spojené s aktivací CDK však nekončí u asociace či disociace komplexu cyklin - CDK. Velkou úlohu při těchto dějích mají také aktivující fosforylace threoninového zbytku, deaktivující fosforylace threoninu a tyrosinu ve vazebném místě pro ATP, vazba přirozeného proteinového inhibitoru, degradace cyklinu po označení ubiquitinem a další (Kryštof a Strnad, 2001).

Přirozené proteinové inhibitory se řadí do dvou odlišných rodin nazývaných CIP/KIP a INK4 (Sherr a Roberts, 1999). První třída inhibitorů zahrnuje proteiny p21, p27 a p57 a prostřednictvím trimerizace inhibuje komplexy CDK2 - cyklin E/A. Tento fakt vede k zastavení buněčného cyklu a to zpravidla v G<sub>1</sub> fázi (Russo *et al.*, 1996). Inhibitory p21 a p27 jsou činiteli jak pozitivních, tak i negativních regulačních procesů ve spojitosti s komplexy CDK 4/6 - cyklin D, neboť jsou vyžadovány pro jejich metabolickou stabilitu, translokaci v jádře, ale také k jejich blokaci v době, kdy jsou právě exprimovány (Cheng *et al.*, 1999; Sherr a Roberts, 1999). Skupinu INK4 tvoří

inhibitory p15, p16, p18 a p19. Interagují s CDK 4/6 za vzniku trimerního komplexu, čímž zabraňují vazbě aktivátoru cyklinu D na tyto CDK (Sridhar *et al.*, 2006).

S přítomností deregulovaných proteinů, CDK a cyklinů v nádorových buňkách je spojena hyperaktivita CDK a kontrola mechanismu buněčného cyklu je velmi limitována (Malumbres a Barbacid, 2009). Mutace, zvýšená exprese cyklinů a CDK, ztráta tvorby RBP a přirozených inhibitorů jsou charakteristickými znaky pro vznik B - buněčného lymfomu, T - buněčného lymfomu, rakoviny tlustého střeva, glioblastomu, neuroblastomu a několika druhů karcinomů. Jedná se např. o karcinom jícnu, prsu, močového měchýře, plic a další. Zadržení buněčného cyklu na G1/S přechodu je nezbytnou součástí prevence rakoviny. Ukázalo se, že inhibice katalytické aktivity CDK pomocí malých molekul, které soutěží s ATP o vazebné místo, se stala velmi úspěšnou strategií v boji proti rakovině (Sridhar *et al.*, 2006). Tyto aspekty položily základ pro vývoj nových inhibitorů CDK jako potenciálních protinádorových léčiv.

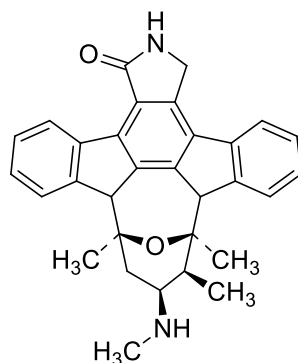
### 3.1.2 Inhibitory CDK, strukturní typy, selektivita, terapeutický potenciál

Chemické inhibitory zaujímají široké spektrum funkcí a mechanismů působení. Ve většině případů se jedná o malé molekuly, které kompetují s ATP o vazebné místo, interagují s fosfothreoninem v T-kliče, působí na vazbu důležitých proteinů a cyklinů, stimulují interakce přirozených inhibitorů, blokují funkci aktivující fosfatázy CDK1, narušují lokalizaci CDK v intracelulárním prostoru a některé typy navozují apoptózu (Meijer, 1996; Knockaert *et al.*, 2002).

Vývoj nových inhibitorů začal krátce po objevu přirozených inhibitorů („Obr. 2“). Brzy bylo známo několik nescifických inhibitorů jako např. staurosporin (produkt plísně *Streptomyces*) nebo suramin (přirozený glykosaminoglykan) působící jako inhibitor topoisomerázy II, antihelmintikum, antiprotozoikum a cytostatikum. Dalším důležitým objevem se staly specifické inhibitory olomoucín a butyrolakton-I (Rialet a Meijer, 1991; Bojanowski *et al.*, 1994; Kryštof *et al.*, 2001). Butyrolakton-I, získán z plísně *Aspergillus*, funguje jako kompetitivní inhibitor s ATP na CDK1 (Kitagawa *et al.*, 1993). Poté následovala identifikace dalších látek jako jsou flavonoidy, paullony, indigoidy a inhibitory purinové struktury (Fisher a Lane, 2000; Kryštof *et al.*, 2001).

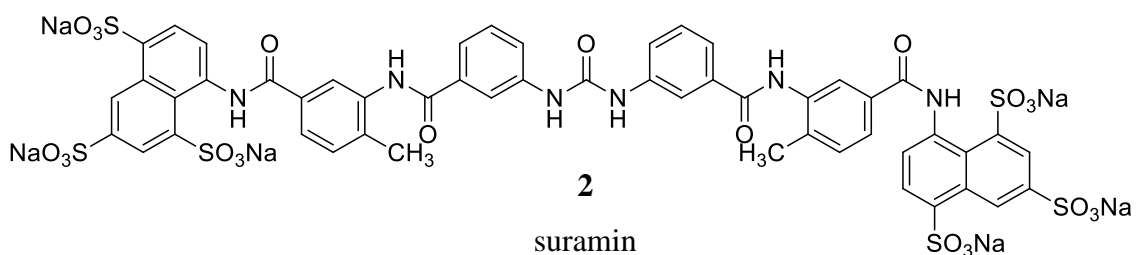
Jeden z nejúčinnějších zástupců flavonových látek je flavopiridol. Jedná se o ATP kompetitivní inhibitor, jenž byl jako první zařazen do klinického testování. To bylo ovšem z důvodu vedlejších nežádoucích účinků zastaveno (Losiewicz *et al.*, 1994;

Kryštof *et al.*, 2001). Skupinu účinných paullonů tvoří deriváty 7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepinu, z nichž nejzajímavější je látka s antiproliferativní aktivitou známá jako kenpaullon (Zaharevitz *et al.*, 1999). Skupinu indigoidů tvoří indirubiny vykazující taktéž schopnost inhibice buněčné proliferace (Hoessel *et al.*, 1999).



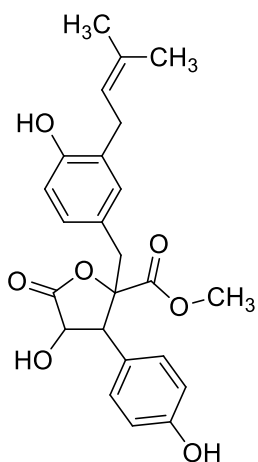
**1**

staurosporin



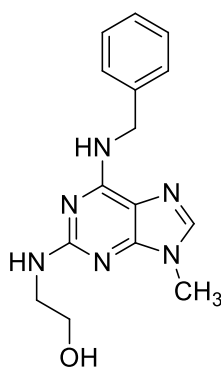
**2**

suramin



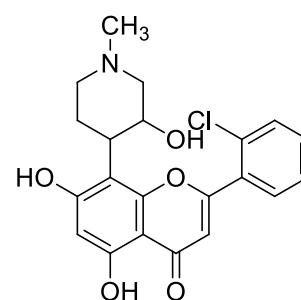
**3**

butyrolakton-I



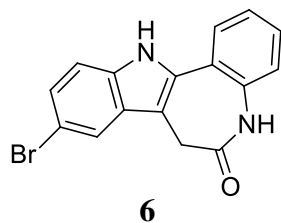
**4**

olomoucín

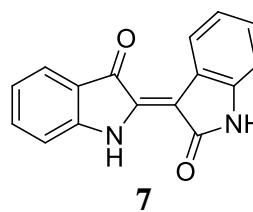


**5**

flavopiridol



kenpaullon



indirubin

Obr. 2: Přehled vybraných strukturních typů inhibitorů CDK.

Sloučenina	IC <sub>50</sub> /nM	
	CDK1	CDK2
staurosporin	3	7
butyrolakton-I	600	1500
olomoucín	7000	7000
flavopiridol	300	400
kenpaullon	400	700
indirubin	10000	2200

Tab. 1: Hodnoty IC<sub>50</sub> vybraných inhibitorů CDK (Kryštof a Strnad, 2001).

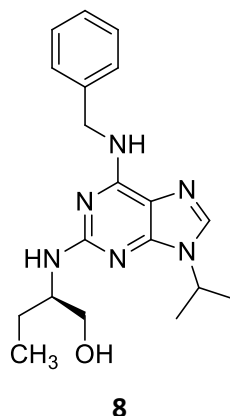
Olomoucín (6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methylpurin) a látky 2,6,9-trisubstituované řady, které od něj byly odvozeny, vykazují silný inhibiční účinek v místě p34 komplexu CDK1 - cyklin B, zřetelně blokují buněčnou proliferaci mnoha nádorových buněčných linií v místě G1/S a G2/M přechodu buněčného cyklu, a také spouští apoptózu v cílových nádorových buňkách *in vitro* a *in vivo*. Díky těmto vlastnostem se olomoucín a jeho strukturně modifikovaná analoga staly předmětem zájmu pro vývoj nových tříd antimitotických a protinádorových léků (Havlíček *et al.*, 1997). Jedním z prvních klinicky testovaných inhibitorů CDK odvozených od olomoucínu se stal roskovitin (6-(benzylamino)-2(R)-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurin) (Havlíček *et al.*, 1997; Meijer a Raymond, 2003). Jedná se o pan-selektivní inhibitor CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9, jehož antiproliferační aktivita koreluje s defosforylací RbP (Havlíček *et al.*, 1997; Whittaker *et al.*, 2004). Inhibicí CDK7 a CDK9 ovlivňuje Roskovitin průběh transkripce a zamezuje tak aktivitě RNA polymerázy II (Kryštof *et al.*, 2005;

MacCallum *et al.*, 2005). Dále má vliv na regulaci antiapoptotických proteinů a s úbytkem hojnosti těchto proteinů se mění rovnováha mezi buněčným přežitím a apoptózou (Jorda *et al.*, 2012). Opticky čistý *R*-enantiomer roskovitinu se stal perspektivní látkou pro další klinické testování jako protinádorové léčivo zejména pro terapii rakoviny plic, nosohltanu a dalších maligních onemocnění (Hsieh *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010).

*R*-roskovitin

CDK2

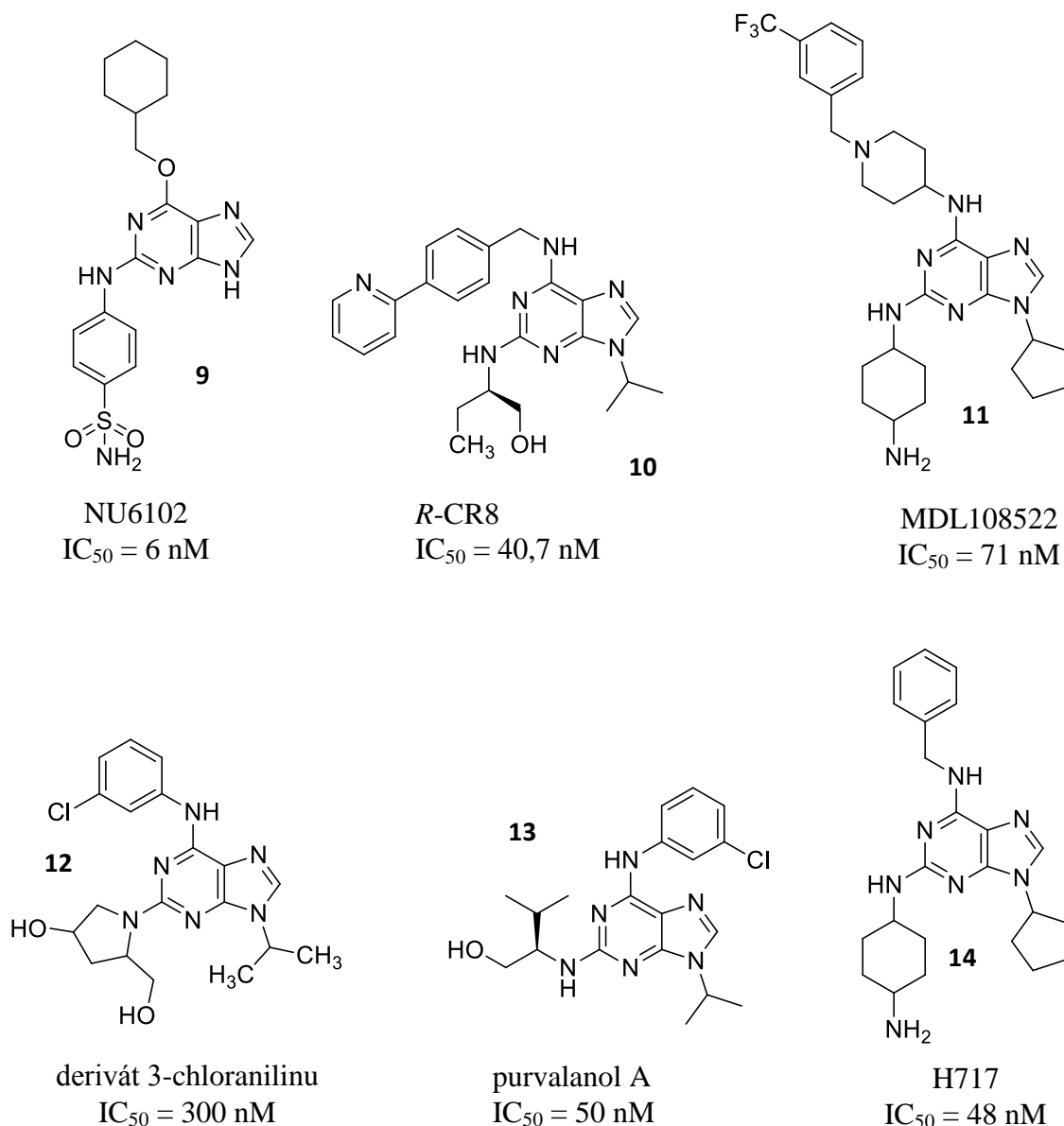
IC<sub>50</sub> = 170 nM



Obr. 3: Struktura *R*-roskovitinu.

Úspěch roskovitinu vedl k vývoji nových strukturně podobných CDK inhibitorů. Změna polohy a poměru atomů dusíku a uhlíku v heterocyklickém jádře spolu s optimalizací substituentů purinového skeletu přispěla k vývoji vysoce aktivních CDK inhibitorů. Jedná se např. o H717, purvalanol A, MDL108522, deriváty 3-chloranilinu, NU2058, NU6102, CR8 a další (Gray *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999; Dreyer *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001; Shum *et al.*, 2001; Hardcastle *et al.*, 2004; Bettayeb *et al.*, 2008).

S výjimkou řady NU mají všechny tyto látky substituenty v poloze C2-, C6-, N9-purinového jádra zachovány. V poloze C2- je navázán alkyl nebo cykloalkylamin, v poloze C6- postranní aromatický řetězec se sekundární aminoskupinou a v poloze N9- malý hydrofobní řetězec v podobě isopropylu nebo cyklopentylu. Mnoho z těchto látek projevilo nejméně stonásobně vyšší inhibiční účinky než roskovitin (Jorda *et al.*, 2012).

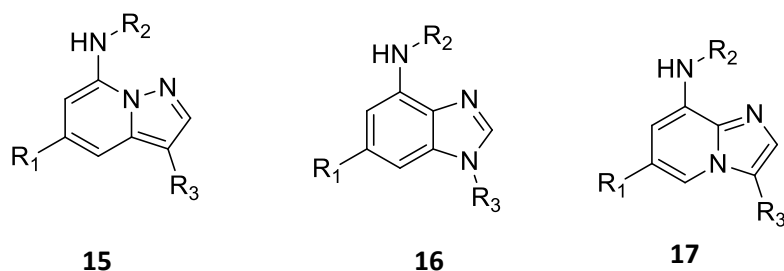


Obr. 4: Struktura inhibitorů odvozených od roskovitinu se zachovaným purinovým jádrem.

Synteticky náročnější modifikace purinového jádra vedly k objevu několika skupin purinových bioisosterů. Největší skupinu tvoří čtyřdusíkaté izomery purinu, ale existují i bioisostery obsahující ve svém jádře dva, tři nebo pět atomů dusíku (Jorda *et al.*, 2012).

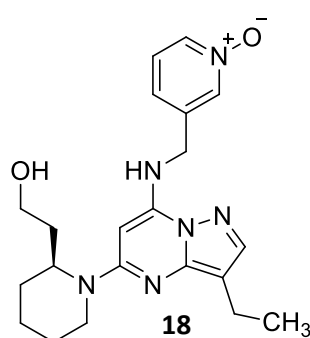
Přestože řadu dvoudusíkatých modifikací purinového jádra tvoří několik potenciálních zástupců, připraveny byly pouze tři a to pyrazolo[1,5-*a*]pyridiny (**15**), benzo[*d*]imidazoly (**16**) a imidazo[1,2-*a*]pyridiny (**17**) (Dwyer *et al.*, 2004a,b; Jain *et al.*, 2011). CDK inhibiční aktivita u imidazo[1,2-*a*]pyridinů a pyrazolo[1,5-*a*]pyridinů

je nižší než u pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů nebo imidazo[1,2-*a*]pyrazinů i přesto, že jsou jejich způsoby vazby na CDK2 identické (Fischmann *et al.*, 2008). 6-O-vázané série benzo[*d*]imidazolů byly navrženy jako účinné CDK5 inhibitory. Bylo však zjištěno, že přímý analog roskovitinu z této řady je méně účinný než původní látka (Jain *et al.*, 2011).



Obr. 5: 2*N* purinové bioisostery.

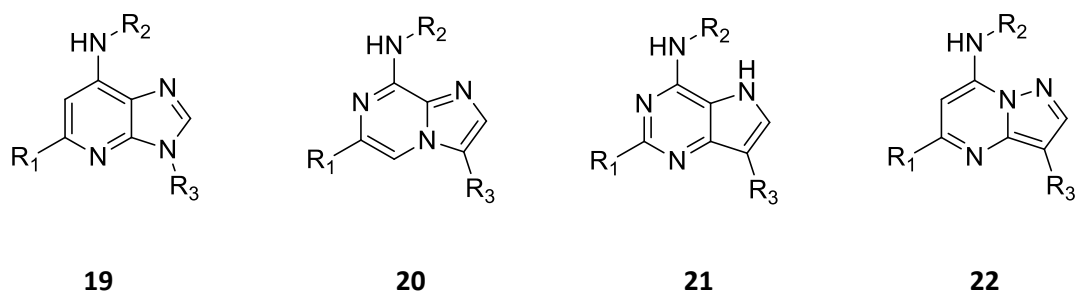
Skupinu třídusíkatých purinových bioisosterů tvoří imidazo[4,5-*d*]pyridiny (**19**), imidazo[1,2-*a*]pyraziny (**20**), pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidiny (**21**) a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny (**22**) (Čapek *et al.*, 2003; Parúč *et al.*, 2004; Meijer *et al.*, 2009; Heathcote *et al.*, 2010). Doposud neúspěšnějším zástupcem je pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinový derivát dinaciclíb (**18**), jenž při studiích prokázal nejlepší terapeutický potenciál, a proto byl vybrán do klinického testování (Parry *et al.*, 2010).



dinaciclíb

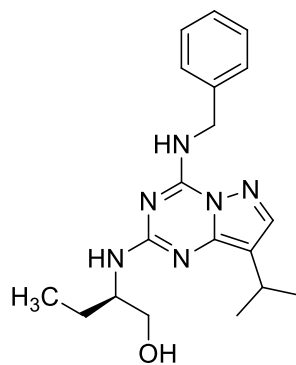
Obr. 6: Struktura dinaciclíbu.





Obr. 7: 3N purinové bioisostery.

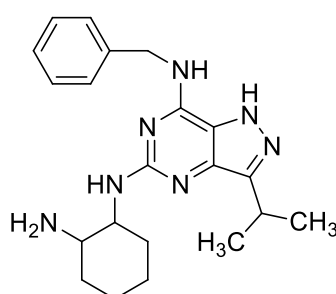
Z řady čtyřdusíkatých izomerů purinového jádra bylo připraveno několik pyrazolo[1,5-*a*]-triazinů (**29**) zahrnujících roskovitinová a purvalanolová analoga (Popowycz *et al.*, 2009). Roskovitinový bioisoster N-&-N1 (**23**) byl publikován jako pan-selektivní inhibitor s dvakrát až třikrát vyšší aktivitou než roskovitin. Bylo zjištěno, že mají podobný farmakokinetický profil a že se vážou téměř stejnými způsoby do aktivního místa CDK2. Při testování proti NCI60 nádorovým buněčným liniím byl roskovitinový bioisoster 14krát účinnější (Bettayeb *et al.*, 2008; Popowycz *et al.*, 2009). Dále byly připraveny série imidazo[2,1-*f*]-triazinů (**28**) zahrnující roskovitinový analog, ten byl však méně účinný než roskovitin (Bettayeb *et al.*, 2008; Popowycz *et al.*, 2009). Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny (**27**) neprokázaly význam při inhibici CDK. Předpokládá se, že důvodem je absence dusíkového atomu v poloze 7- purinového jádra, což je stěžejní faktor pro navázání inhibitoru do aktivního místa v CDK (Jorda *et al.*, 2012). Látky triazolo[1,5-*a*]pyrimidinové (**26**) struktury byly studovány jako analoga NU6102 (**25**, PDB:2C6M) a H717. Metodou X-ray analýzy byla potvrzena inhibiční aktivita látky PDB:2C6M vůči CDK2 i CDK1 (Richardson *et al.*, 2006). Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny (**30**) byly připraveny jako 2,7-disubstituované a 3,5,7-trisubstituované deriváty (Moravcová *et al.*, 2003). Látka LGR1406 (**24**) prokázala inhibiční účinek při abnormální vaskulární proliferaci buněk hladkého svalstva (Sroka *et al.*, 2010). V porovnání s roskovitinem se nejedná o účinnější látku, ale při studiu roskovitinového analoga této řady látek bylo dokázáno, že má lepší selektivitu a protinádorovou aktivitu než samotný roskovitin (Jorda *et al.*, 2011).



**23**

N-&-N1

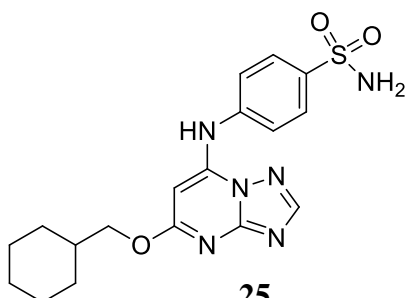
Obr. 8: *Struktura roskovitinového bioisosteru N-&-N1.*



**24**

LGR 1406

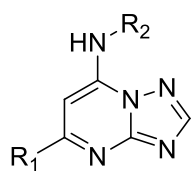
Obr. 9: *Struktura látky LGR1406.*



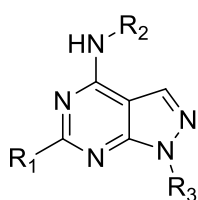
**25**

PDB: 2C6

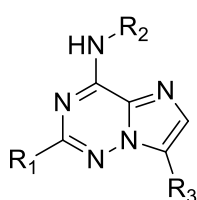
Obr. 10: *Struktura látky PDB:2C6.*



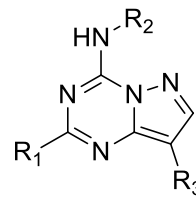
**26**



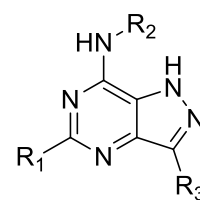
**27**



**28**



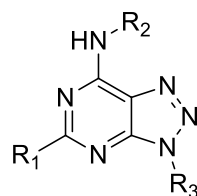
**29**



**30**

Obr. 11: *4N purinové bioisostery.*

1,2,3-triazolo[4,5-d]pyridinové pětiusíkaté purinové bioisostery vykazují značně nižší inhibiční aktivitu a to pravděpodobně z důvodu nepříznivé interakce dusíkového atomu v poloze 2- s Glu81 v aktivním místě CDK2 (Havlíček *et al.*, 2005).



**31**

*Obr. 12: 5N purinové bioisostery.*

### 3.2 Cíleně směřovaná protinádorová léčiva

Přestože bylo mnoho selektivních inhibitorů CDK klinicky testováno, žádný z nich nebyl z důvodu vedlejších nežádoucích účinků a nepříznivých farmakologických vlastností doposud schválen (Tong *et al.*, 2010; Massard *et al.*, 2011). Jeden z nejzávažnějších problémů tradiční chemoterapie nádorových onemocnění je malá nebo žádná specifita k nádorovým buňkám, což vede k systémové toxicitě. To může být potlačeno užitím cíleného směřování léčiv. V poslední době se toto směřování stalo předmětem intenzivních studií a ukázalo se, že představuje jeden z nadějných přístupů, jak zvýšit specifitu chemoterapie a současně snížit četnost a intenzitu nežádoucích účinků jako je vypadávání vlasů, poškození jater, ledvin a kostní dřeně (Jaracz *et al.*, 2005). Skutečností, že nádorové buňky nadměrně exprimují mnoho receptorů, lze využít pro selektivní transport cytotoxického činidla do tumoru. Selektivní transport může být zprostředkován pomocí konjugátů tvořených cytotoxickým činidlem spolu s látkou, kterou nádorová buňka rozpozná a přijme. Jedná se např. o látky, jako jsou polynenasycené mastné kyseliny, monoklonální protilátky, řadí se zde také kyselina hyaluronová, kyselina listová nebo polyaminy. Tyto látky tedy slouží jako „dopravní prostředek“ terapeutika (cytotoxického činidla) a na základě jejich specifické vazby na receptory nádorových buněk se mohou aktivní látky dostat přímo k místu svého účinku (Jaracz *et al.*, 2005; Palmer a Wallace, 2010).

### 3.2.1 Stručný přehled možností cíleného směřování

Cílené směřování s využitím **monoklonálních protilátek** (mAb) má z hlediska terapeutické účinnosti velký význam. Monoklonální protilátky totiž působí selektivně vůči antigenům exprimovaným na povrchu nádorových buněk, což vede ke snížení systémové toxicity a zvýšení terapeutického potenciálu. Nedávné pokroky v biotechnologii urychlily vývoj ve farmaceutické oblasti. Bylo zjištěno, že je cytotoxická část připojena k mAb v imunokonjugátu přes linker. Struktura mAb, typ linkeru a cytotoxické (terapeutické) části hrají důležitou roli v úspěšném navrhování účinných imunokonjugátů. Součástí charakteristické struktury mAb jsou 2 lehké a 2 těžké řetězce spojené disulfidovými vazbami („Obr. 13“; Jaracz *et al.*, 2005).

Linkery mohou být obecně rozděleny na štěpitelné a neštěpitelné. Štěpitelné linkery jsou závislé na specifických biochemických reakcích probíhajících v lysozomech (např. pH -dependentní hydrolýza, proteolytické štěpení, apod.). Pokud je konjugát takovýmito reakcím podroben, dojde k jeho rozštěpení právě v místě linkeru a dochází tak k uvolnění cytotoxické látky do místa účinku. V případě neštěpitelných linkerů je uvolnění cytotoxického činidla v lysozomech závislé na degradaci konjugátu jako celku. V ideálním případě pro oba typy linkerů platí, že jsou za normálních podmínek stálé a účinnému štěpení podléhají až v nádorové tkáni (Jaracz *et al.*, 2005; Chu a Polson, 2013).

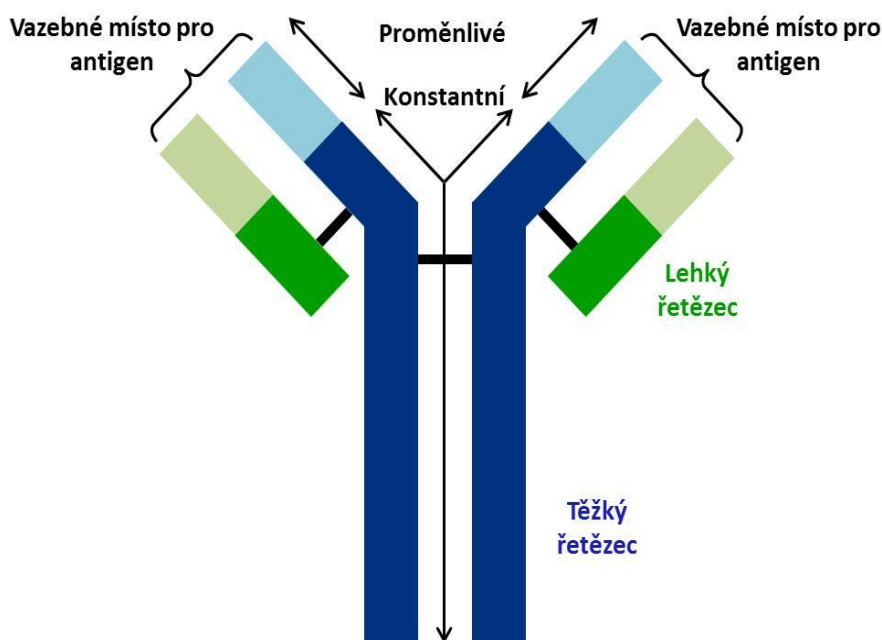
Dále mohou být linkery rozděleny na hydrazonové, peptidové a disulfidové. Hydrazonové linkery využívají k rozštěpení imunokonjugátu kyselých podmínek v lysozomech (pH ~ 5) skrze neenzymovou hydrolýzu a obsahují dvě štěpitelné vazby, hydrazon a stericky bránící disulfid (Hamann *et al.*, 2002a). Tento typ linkeru byl použit v gemtuzumab ozogamicinu (Mylotarg®) obsahujícím humanizovanou mAb P67,6 konjugovanou s vysoce účinným terapeutikem N-acetyl- $\gamma$ -calicheamicinem. Mylotarg® byl v roce 2000 schválen FDA (Food and Drug Administration) pro léčbu akutní myeloidní leukémie. V roce 2010 byl však stažen z trhu, jelikož neprokázal přínos ve třetí fázi klinického testování. (Jaracz *et al.*, 2005; Chu a Polson, 2013). Dalším příkladem, jenž obsahuje hydrazonový linker je BR96-DOX konjugát (**32**) (Kaneko *et al.*, 1991).

Peptidové linkery jsou určeny pro rychlé lysozomální hydrolýzy a vysokou stabilitu v séru. Používají se například tetrapeptidové nebo dipeptidové linkery. Dipeptidové typy linkerů byly využity pro konjugát doxorubicin s mAb BR96 a bylo prokázáno, že

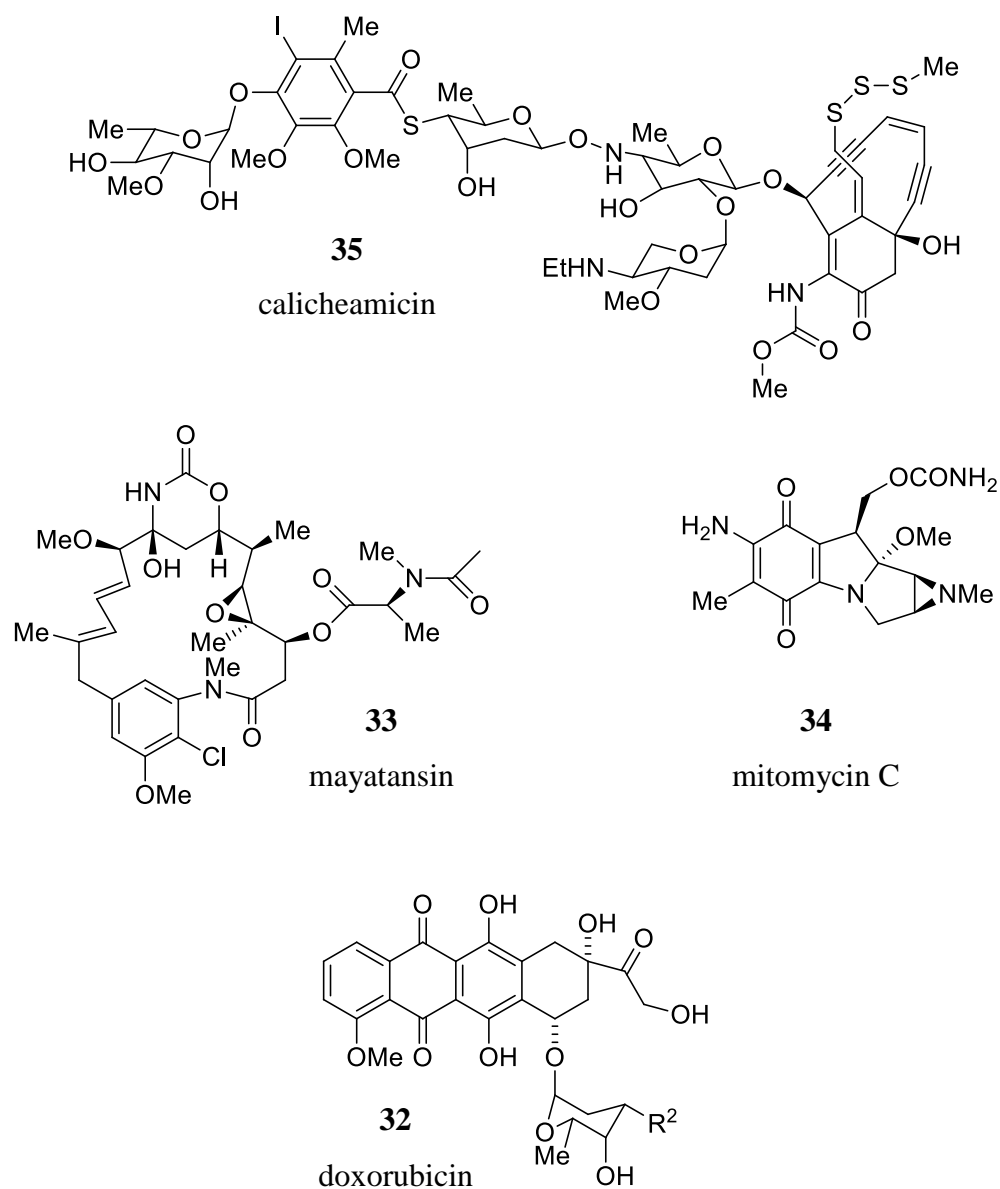
jsou stabilnější než linkery hydrazonové (Sinha *et al.*, 2001; Jaracz *et al.*, 2005). Dalším zástupcem je brentuximab vedotin, jenž byl schválen v roce 2011 pro léčbu Hodgkinova lymfomu a anaplastického velkobuněčného lymfomu (Chu a Polson, 2013).

Disulfidové linkery jsou štěpeny v nádorových buňkách prostřednictvím disulfidové výměny s intracelulárním thiolem jako je glutathion (Kigawa *et al.*, 1997). Užití disulfidových linkerů je atraktivní, protože v porovnání s běžnými buňkami je koncentrace glutathionu v nádorových buňkách mnohem vyšší. Příkladem, kde je využito spojení disulfidovým linkerem, je konjugát tvořený mayatansinem (**33**) nesoucím methyldisulfanylovou skupinu spojenou s humanizovanou mAb CD44v6 (Lam *et al.*, 2003).

Vedle volby linkeru je též důležité zvolit dostatečně aktivní cytotoxickou část, neboť je množství exprimovaných antigenů na povrchu nádorových buněk omezeno. Například mitomycin C (**34**) je jedním z případů, u kterého nebyl při studiích *in vivo* prokázán výrazný protinádorový účinek, což bylo pravděpodobně způsobeno mírnou cytotoxicitou látky. Proto byla pozornost přesunuta k účinnějším látkám jako právě calicheamicinu (**35**) a dalším (Manabe *et al.*, 1985; Hamann *et al.*, 2002b).



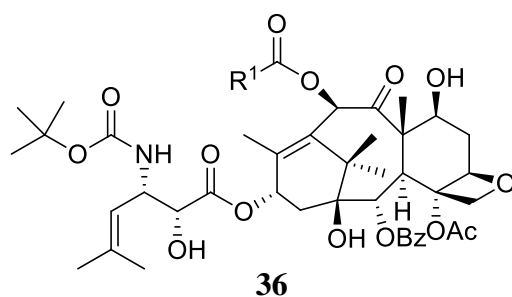
Obr. 13: Struktura protilátky.



Obr. 14: Struktury vybraných cytotoxických látek pro konjugaci s mAb.

**Polynenasycené mastné kyseliny** (PUFA) lze také využít pro cílený transport terapeutik do nádorových buněk. Jedná se o esenciální látky, které je možno přijímat pouze ze stravy. Mezi zástupce PUFA patří kyselina linolenová (LNA), linolová, arachidonová, eikosapentaenová a dokosaheptaenová (DHA) (Jaracz *et al.*, 2005). Bylo dokázáno, že jsou přijímány nádorovými buňkami za účelem zásob energie a biochemických prekurzorů (Sauer *et al.*, 1986; Sauer a Dauchy, 1992). Kromě toho jsou PUFA snadno začleněny do lipidové dvojvrstvy, což má za následek narušení struktury a pohybu membrány (Takahashi *et al.*, 1992; Grammatikos *et al.*, 1994). Konjugát tvořený dokosaheptaenovou kyselinou a paclitaxelem (Taxoprexin®) projevil při

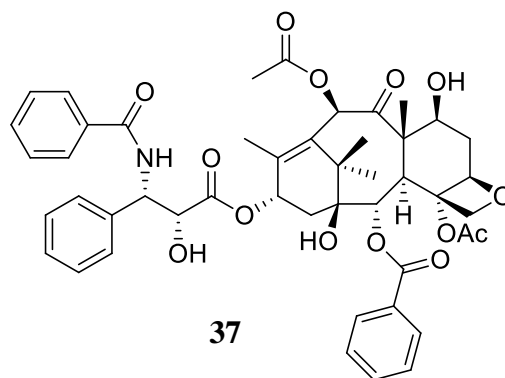
studiích protinádorové aktivity a systémové toxicity na xenografických modelech myší s plicním tumorem lepší vlastnosti než samotný paclitaxel. Tento konjugát je navíc stabilní v krevní plazmě a jeho koncentrace v buňkách jsou udržovány po dlouhou dobu, tudíž se cytotoxická látka uvolňuje pomalu a dlouhodobě. Taxoprexin® byl schválen FDA a postoupil fáze III klinických zkoušek (Ernstoff, 2003). Ačkoliv Taxoprexin® projevila imponující protinádorovou aktivitu, není účinný proti multirezistentním nádorům. Multirezistentní nádorové buňky nadměrně exprimují účinný ATP přenašeč P-glykoprotein, který vytěsňuje hydrofobní protinádorové látky jako je paclitaxel. Pozitivní je skutečnost, že je Taxoprexin® slabším substrátem pro P-glykoprotein, tudíž není z buněk vylučován tak snadno jako paclitaxel. Dále byly vyvinuty další účinné konjugáty s využitím DHA nebo LNA v kombinaci s SB-T-1213 nebo SB-T-1214 a vůči nádorům vaječníků xenografických modelů myší vykazoval typ SB-T-1213 v konjugaci s DHA vyšší protinádorové účinky než Taxoprexin® (Geney *et al.*, 2005).



R<sup>1</sup> = ethyl, SB-T-1213

R<sup>1</sup> = cyklopropyl, SB-T-1214

Obr. 15: Struktura SB-T-1213 a SB-T-1214.



*Obr. 16: Struktura paclitaxelu.*

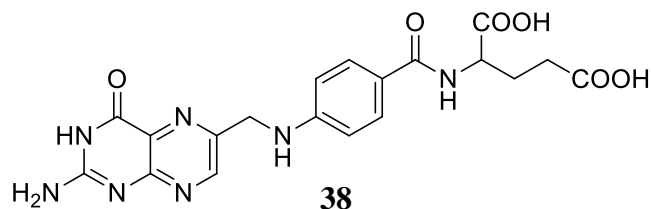
Další možností, jak vpravit chemoterapeutikum do nádorových buněk, je transport s využitím **kyseliny listové**. Kyselina listová patří do rodiny vitamínu B a při tvorbě nových buněk se účastní biosyntézy nukleotidových bází. Tato kyselina je po přijetí stravou endocytoticky transportována prostřednictvím folátového receptoru (FR) do buněk epitelu (Anderson *et al.*, 1992). Existují dva typy membránových receptorů s označením FR- $\alpha$  a FR- $\beta$  (Elnakat a Ratnam, 2004). V normálních tkáních je tvorba FR nízká. Naproti tomu jsou FR nadměrně exprimovány např. v nádorových buňkách vaječníků a děložní výstelky. Metodou radioaktivního značení bylo zjištěno, že se [ $^3\text{H}$ ]kyselina listová váže s až dvacetinásobnou pravděpodobností na nádorové buňky v porovnání s běžnými epiteliálními buňkami či fibroblasty (Wietman *et al.*, 1992).

Již několik let je studium cíleného směřování s využitím kyseliny listové zaměřeno na její makromolekulární konjugáty nesoucí protinádorová terapeutika. Makromolekulárními transportéry pro tyto konjugáty mohou být proteiny, polymerní micely, liposomy, syntetické polymery nebo nanočástice (Říhová, 1998; Kataoka *et al.*, 2001; Lu a Low, 2002; Gabizon *et al.*, 2004; Hattori a Maitani, 2004). Ačkoliv exprese FR v ledvinách není tak významná jako v nádorových buňkách, jakékoliv poškození ledvin by mohlo způsobit vedlejší nežádoucí účinky. Z tohoto hlediska bylo použití makromolekulárních nosičů shledáno pozitivním, jelikož tvorba FR v ledvinách probíhá v místech, kde se makromolekuly nemohou dostat, a proto je přítomnost nežádoucí toxicity eliminována (Jaracz *et al.*, 2005).

Vedle výše uvedených konjugátů kyseliny listové bylo popsáno několik dalších, které pro svůj transport nevyužívají makromolekulární nosiče. Jako cytotoxická činidla byly použity látky paclitaxel, mayatansin, mitomycin C a další (Jaracz *et al.*, 2005). Paclitaxel byl konjugován s kyselinou listovou pomocí oligoethylenglykolového linkeru a v tomto spojení prokázal vyšší účinky, než samotný paclitaxel. Stejná situace nastala při vývoji dalších konjugátů typu paclitaxelu obsahujících estery či karbamáty kyseliny listové v poloze C7- nebo C2'-, jež byly testovány *in vitro* proti liniím nádorových buněk plic, prsu a tlustého střeva. Při testování *in vitro* a *in vivo* proti KB buněčné linii však žádná z těchto látek neprojevila selektivní toxicitu (Lee *et al.*, 2002). Dále byl připraven účinný derivát myatansoidu spojený s kyselinou listovou disulfidovou vazbou, jenž projevil stonásobně vyšší toxicitu vůči FR-pozitivním buňkám v porovnání s buňkami FR-negativními (Ladino *et al.*, 1997). Doxil®, liposomální forma doxorubicinu skládající se z fosfatidylcholinu, cholesterolu a PEG-distearoyl-

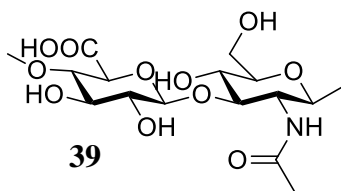


fosfatidylethanolaminu, byl také testován jako konjugát s kyselinou listovou a při testování in vitro projevil stonásobně vyšší účinek než Doxil® samotný (Vaage *et al.*, 1992; Goren *et al.*, 2000).



Obr. 17: Kyselina listová.

**Kyselina hyaluronová (HA)**, polysacharid složený z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, je zodpovědná za různé funkce jako je růst, dělení nebo pohyb buněk. Široká škála činností je pravděpodobně způsobena přítomností mnoha receptorů, které jsou k této kyselině afinitní (Toole, 1981, Jaracz *et al.*, 2005). HA může být spojena s cytotoxickým činidlem přímo za vzniku netoxického proléčiva nebo lze jako přenašeč použít vhodný polymer kovalentně vázaný na HA a terapeutikum (např. N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidový polymer). Přímá konjugace s protinádorovým léčivem byla využita u látek jako je kyselina másečná, paclitaxel, doxorubicin a další. Tyto biokonjugáty jsou přijímány rakovinovými buňkami receptorem zprostředkovanou endocytózou. Poté následuje uvolňování účinných látek v intracelulárním prostoru a tím k obnově jejich původní cytotoxicity (Goradini *et al.*, 1999; Luo a Prestwich, 1999; Luo *et al.*, 2002).

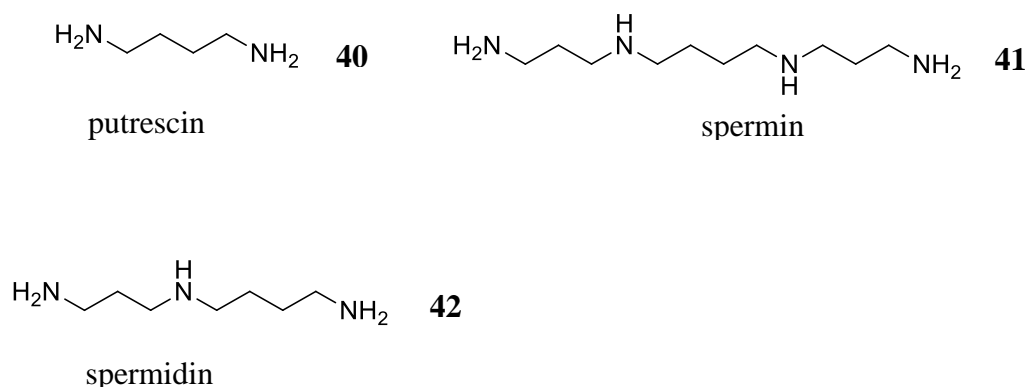


Obr. 18: Kyselina hyaluronová.

Výše uvedené typy cíleného směřování jsou ve většině případů omezeny na jeden specifický receptor či cestu. Připojení protinádorových léčiv k molekule transportované do nádorových buněk pomocí selektivního transportního systému by mohlo být atraktivní alternativou. Příkladem takového systému je polyaminový transportní systém.

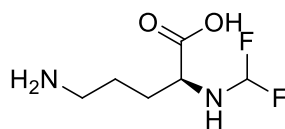
### 3.2.2 Cílené směřování s využitím polyaminů - koncept, příklady

Putrescin (Put; 1,4-butandiamin), spermidin (Spd; N<sup>1</sup>-(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin) a spermin (Spm; N<sup>1</sup>, N<sup>4</sup>-bis(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin) jsou biogenní polyaminy přítomné ve všech savčích buňkách. Za fyziologických podmínek jsou protonovány a podílejí se na mnoha krocích proteinové syntézy. Mají vliv na biologické funkce proteinů, stabilitu konformace nukleových kyselin a procesy buněčného růstu a dělení (Seiler *et al.*, 1996). Stěžejní role polyaminů v buněčné proliferaci vzbudila pozornost na polyaminový metabolismus a jeho vliv na vývoj v oblasti chemoterapie.



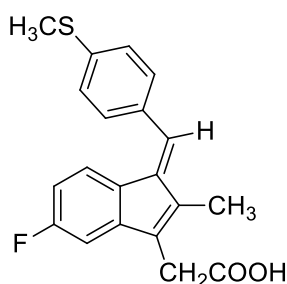
Obr. 19: Přírodní polyaminy.

V průběhu minulých let byla připravena řada látek, jejichž účinek měl vést k významnému snížení intracelulární koncentrace polyaminů, které vede k inhibici buněčného růstu. (Casero a Marton, 2007). Bylo zjištěno, že koncentraci polyaminů v buňkách lze snížit užitím činidel inhibujících enzymy, jež se podílejí na syntéze těchto polyaminů (Wallace a Fraser, 2004). Úspěch zmíněného přístupu byl však omezen, jelikož buňky upravené o sníženou syntézu polyaminů zvýšily příjem exogenních polyaminů prostřednictvím svých polyaminových transportních systémů (PTS). Navzdory tomuto zklamání byla vyvinuta látka  $\alpha$ -difluormethylornithin (DFMO), jež prokázala pozitivní účinky v primární léčbě rakoviny tlustého střeva a to jak při samotném podání, tak i v kombinaci s nesteroidním protizánětlivým léčivem sulindac (Love *et al.*, 1998; Meyskens *et al.*, 1998).



43

Obr. 20: Struktura DFMO.



44

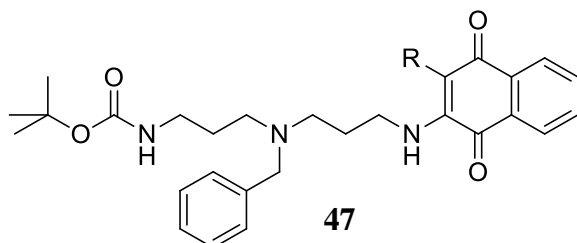
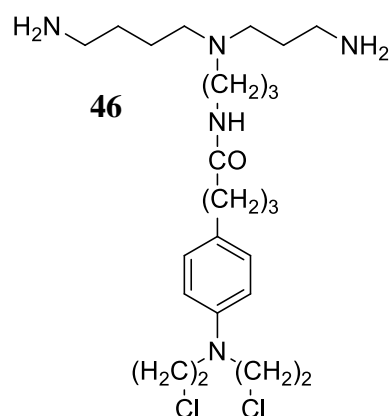
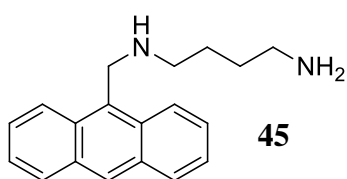
Obr. 21: Sulindac.

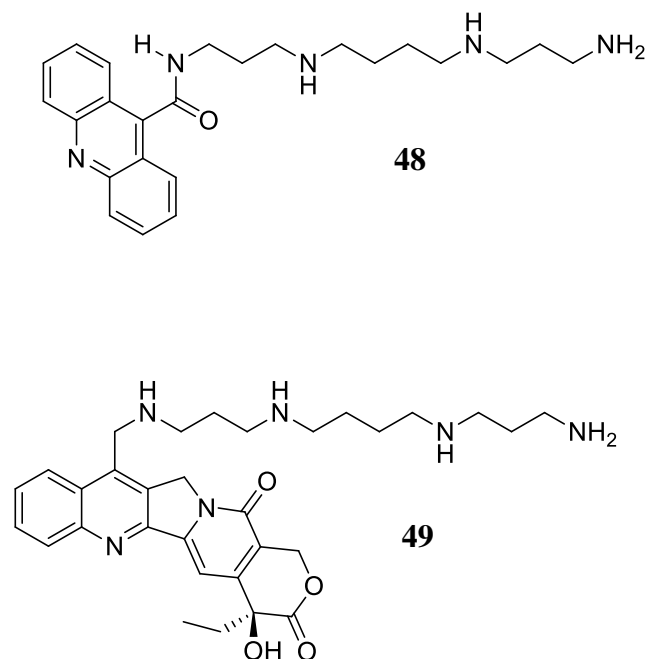
Dále bylo během studií potvrzeno, že je aktivita PTS v proliferujících buňkách mnohem vyšší než v buňkách v klidovém stavu. Stejná situace nastává v případě nádorových tkání v porovnání s tkáněmi zdravými (Bachrach *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1981). Vysoká aktivita PTS nádorových buněk je pravděpodobně spojena s neschopností biosyntetických enzymů poskytovat dostatečné množství polyaminů k rychlému buněčnému dělení. Toto omezení si nádorové buňky kompenzují vychytáváním polyaminů z vnějších zdrojů (Cullis *et al.*, 1999). Polyaminy lze získávat konzumací citrusových plodů, brokolice, kvěťáku či masa. Mikrobiální flóra gastrointestinálního traktu je též bohatá na polyaminy. Je-li přítomnost exogenních polyaminů eliminována polyaminovou dietou spolu s dekontaminací gastrointestinálního traktu, biologické parametry se vrátí do normálu a dochází tak ke snížení metastáz. Tento přístup byl aplikován při studiích rakoviny prostaty u člověka a nesl s sebou pozitivní výsledky (Cipolla *et al.*, 2006).

Vzhledem k pozitivnímu náboji polyaminů musí všechny buňky obsahovat PTS pro příjem exogenních polyaminů. Je také známo, že je PTS teplotně, koncentračně, časově

a energeticky závislý. Některé buněčné typy, např. myší leukemické buňky linie L1210 mají jednoduchý PTS, jenž je schopen vychytávat všechny tři typy putrescin, spermin i spermidin (Porter *et al.*, 1984). Nicméně ve většině buněčných typů jsou dva druhy PTS. První z nich je závislý na sodíku a preferuje putrescin, i když je schopen transportovat i spermin a spermidin. Druhý typ je nezávislý na sodíku a přenáší spermin a spermidin, putrescin nikoliv (Seiler a Dezeure, 1990; Seiler *et al.*, 1996). Dále existují dva mechanismy přenosu polyaminů do buněk. Jednou z možností je vazba polyaminu na heparansulfát v místě molekuly glypicanu-1 s následnou receptorem zprostředkovanou endocytózou. Druhou možností je přenos polyaminů pomocí membránových transportérů využívajících elektronový transportní systém (Belting *et al.*, 2003; Soulet *et al.*, 2004).

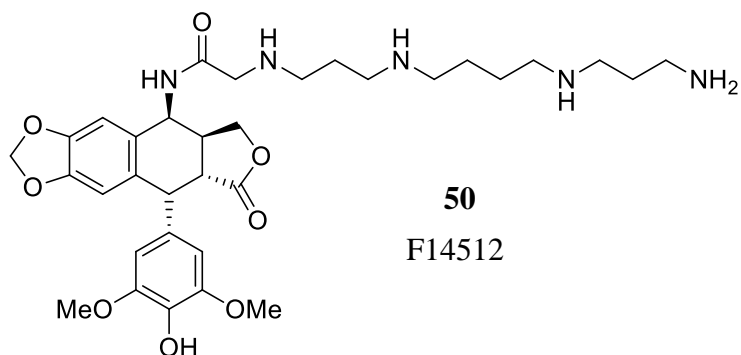
PTS je možno využít pro cílený transport cytotoxických léčiv. Cytotoxické terapeutikum může být navázáno na polyamin, který nádorová buňka rozpozná a přijme. Tímto způsobem se účinná látka dostane dovnitř buňky, kde může projevit své terapeutické vlastnosti (Cullis *et al.*, 1999). Bylo publikováno několik příkladů konjugátů s cytotoxickými látkami jako jsou chlorambucil, nitroimidazol, aziridin, akridiny, antraceny, naftochinony, camptothecin a protoberberin (Holley *et al.*, 1992a,b; Eiseman *et al.*, 1998; Delcros *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2006; Dallavale *et al.*, 2006; Phanstiel *et al.*, 2007). Všechny tyto konjugáty byly připraveny jako DNA-vázaná činidla, jež využívají vysokou afinitu polyaminových kationtů k DNA (Barret *et al.*, 2008).





Obr. 22: Struktury vybraných konjugátů s polyaminy.

Dnes nejvýznamnějším konjugátem je látka F14512 tvořena epipodophyllotoxinovým jádrem jako inhibitorem topoisomerázy II v kombinaci se sperminovým koncem jako vektorem pro přenos terapeutika do nádorových buněk. Tato látka prokázala pozitivní účinky při testování na lidských nádorových liniích akutní myeloidní leukémie. F14512 byla testována *in vitro* a *in vivo* v kombinaci s cytosinarabiosidem a prokázala zvýšenou anti-leukemickou aktivitu. F14512 je v současné době ve fázi I klinických studií (Kruczynski *et al.*, 2013).

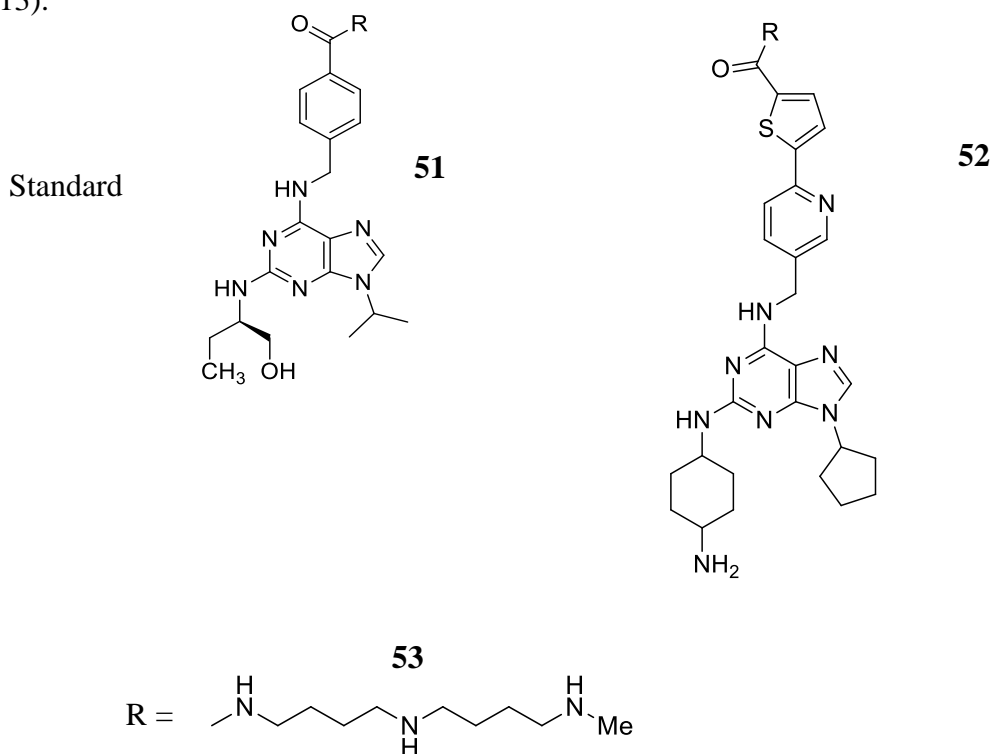


Obr. 23: Struktura látky F14512.

### 3.2.3 Možnosti využití polyaminů pro směřování 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu, design konjugátů s ohledem na znalost vazebného místa v CDK2

Za posledních několik let bylo provedeno studium vztahu mezi strukturou a aktivitou (SAR) purinových inhibitorů CDK a jejich příbuzných bioisosterů (Lapenna a Giordano, 2009; Kryštof a Uldrijan, 2010; Jorda *et al.*, 2012). Struktura vazebného místa v různých CDK pro takové inhibitory byla stanovena pomocí rentgenostrukturní analýzy a na základě těchto skutečností by mělo být snadné najít vhodná místa pro spojení inhibitorů se směřovanými zbytky (Leamon *et al.*, 2011).

Tato práce je zaměřena na studium konjugátů 2-aminocykloalkyl-6-heterobiarylamo-9-cykloalkyl-9*H*-purinových derivátů s polyaminy. Jako standard pro porovnání výsledků je uveden derivát roskovitinové struktury. Z dřívějších studií SAR je zřejmé, že nejvhodnějším místem pro spojení s vybraným polyaminem je para-položka aromatického zbytku purinového derivátu. Prodloužení substituentů v poloze 2- stejně jako v poloze 9- snižuje schopnost vazby na aktivní místo v CDK. Z hlediska organické syntézy je výstavba para- polohy aromatické části purinového prekurzoru poměrně snadná. Konjugáty s polyaminy jsou navrženy jako amidy (Gucký *et al.*, 2013).



Obr. 11: Navržené konjugáty pro polyaminový transportní systém.

Thiofenový derivát byl pro konjugaci vybrán z důvodu vysoké inhibiční aktivity a cytotoxicity. Jeho CDK 2 inhibiční aktivita ( $IC_{50}$ ) je 4 nM a průměrná hodnota cytotoxicity 0,09  $\mu$ M (Gucký *et al.*, 2013). Polyamin obsahující methylovou skupinu byl zvolen z důvodu zvýšené metabolické stability (Muth *et al.*, 2013).

### 3.2.4 Potenciál studia biologické aktivity navržených konjugátů

Na výsledky již zmíněných a dalších konjugátů bude v blízké budoucnosti navázáno studium biologické aktivity konjugátů a prekurzorů. Budou porovnávány jejich interakce s vazebným místem v CDK. V rámci zjišťování biologické aktivity budou použity vybrané proteinové standardy (doména CDT RNA polymerázy II, histon H1, Rb protein a další) a v případě, že konjugáty prokážou významnou inhibiční aktivitu vůči CDK, bude následovat studium selektivity na dalších protein-kinázách (Abl, AURKB, CK1, CK2, GSK3, PAK4, PAK5).

Dále budou studovány ekvimolární a toxické účinky jak prekurzorů, tak konjugátů na dobře charakterizovaných liniích lidského karcinomu (MTT). Bude porovnána cytotoxická aktivita samotných a konjugovaných prekurzorů na zdravých buněčných liniích (fibroblasty, hepatocyty) a liniích nádorových. Látky s vyšší antiproliferativní a cytotoxickou aktivitou budou z hlediska účinků na buněčné dělení a buněčnou smrt studovány hlouběji. Expres buněčného cyklu a regulační proteiny podílející se na apoptóze jako jsou cykliny, přirozené inhibitory, E2F, protein p53 a další budou zkoumány se specifickými protilátkami analytickou technikou imunoblottingem léčených buněk v závislosti na čase a dávce. Schopnost připravených látek indukovat buněčnou smrt bude hodnocena pomocí biochemických metod, fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie.

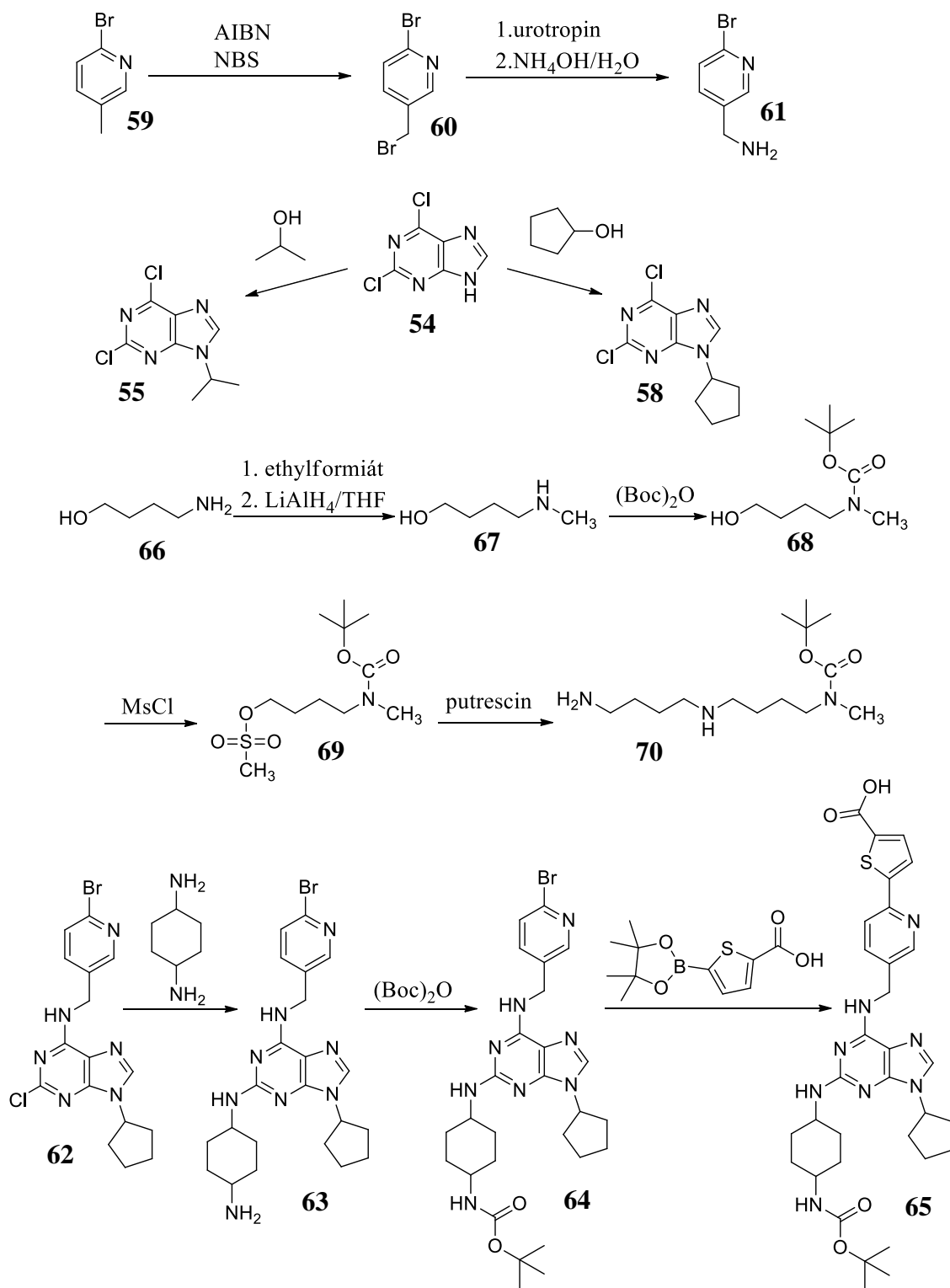
Při studiu cíleného transportu polyaminů na úrovni *in vitro* bude zkoumána aktivita připravených látek na buňkách s vysokou a nízkou expresí receptorů. Buněčná akumulace polyaminových konjugátů bude analyzována užitím fluoroforem značeného sperminového derivátu F16746. Jako substrát bude použit [ $^3$ H]-značený putrescin. Buňky budou kultivovány v přítomnosti 5 nM [ $^3$ H] putrescinu s 5nM DFMO či bez DFMO. V kompetitivních experimentech budou buňky léčeny společně pomocí volných polyaminů (putrescin, spermidin, spermin). Pro kontrolní experimenty bude použita specifická siRNA, která snižuje expresi proteinu calveolinu-1, což vede k zesílení polyaminového transportu (Roy *et al.*, 2008). Hodnoty  $IC_{50}$  budou odečteny z křivek

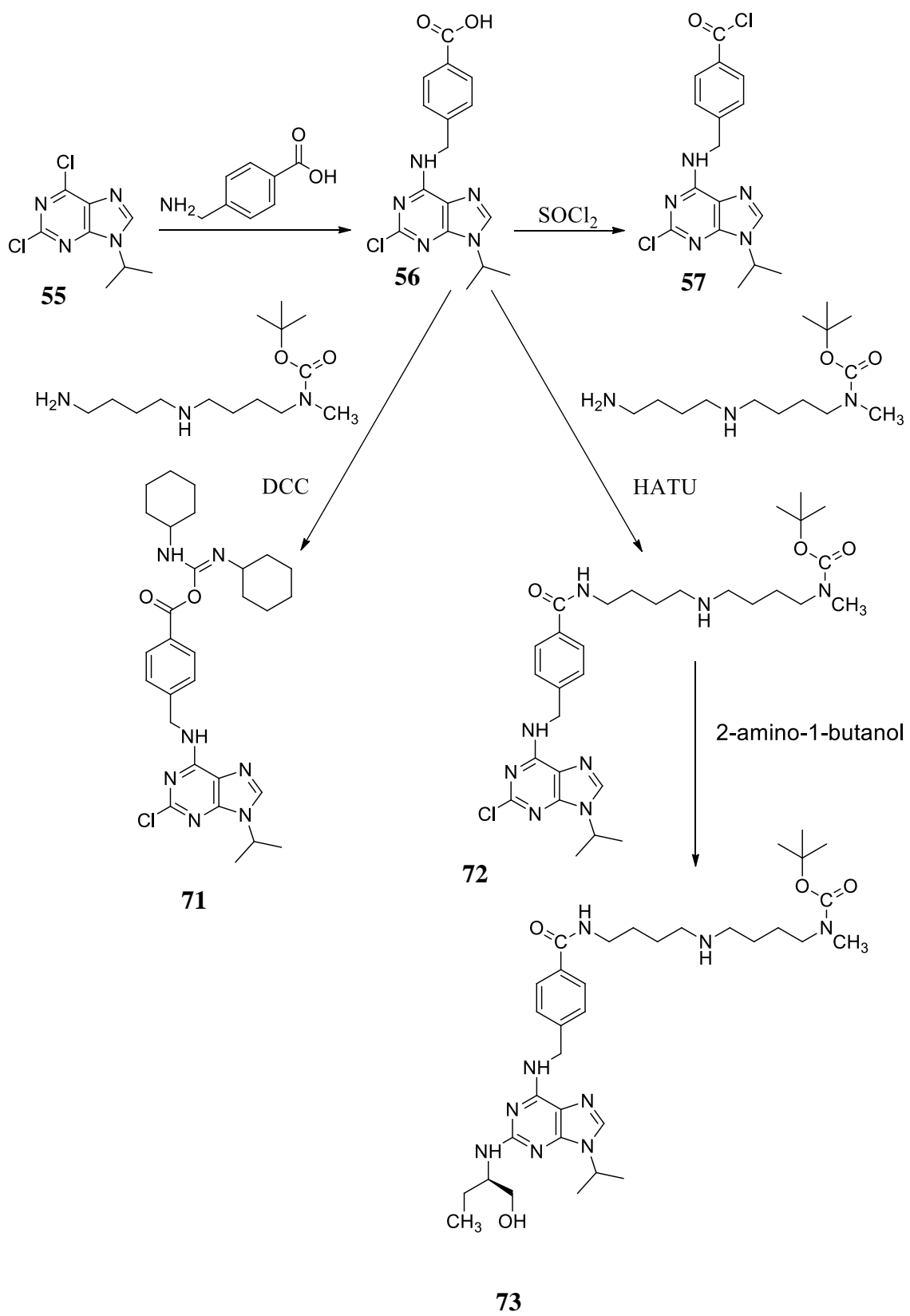
závislosti odpovědi na dávce. Pro kvantitativní analýzu konjugátů v intracelulárním prostoru bude použita kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS).

In vivo experimenty budou prováděny na xenografických modelech myši s nádorovou linií lidských buněk (např. IGROV-1, JEG-3).  $5 \cdot 10^5$  nádorových buněk bude injekčně převedeno subkutánně nebo intraperitoneálně a po vytvoření hmatatelných nádorů v myších modelech bude uskutečněna léčba pomocí konjugátů v různých dávkách. V časovém průběhu budou tkáně zkoumaných modelů pozorovány a koncentrace konjugátů v tkáních a orgánech budou analyzovány pomocí LC/MS.



## 4. Dosažené výsledky





## 4.1 Syntéza prekurzorů

Pro přípravu látek **55** a **58** byl použit komerčně dostupný 2,6-dichlorpurin, jenž byl substituován isopropanolem či cyklopentanolem za podmínek Mitsunobu alkylace. Byl získán 9-(cyklo)alkyl-2,6-dichlor-9*H*-purin s 90% regioselektivitou vůči poloze N9-purinového jádra. N7- isomer byl odstraněn krystalizací z ethanolu (Dreyer *et al.*, 2001 Malumbres a Barbacid, 2005).

Nová látka **56** byla získána reakcí S<sub>N</sub>2 4-aminomethylbenzoové kyseliny s 2,6-dichlor-9-isopropyl-9*H*-purinem v přítomnosti N,N,-diisopropyl-N-ethylaminu.

Další nová látka, 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-ylamino)-methyl]-benzoylchlorid (**57**), byla připravena z důvodu zvýšení reaktivity pro konjugaci s polyaminy. Záměna OH skupiny za chlor byla provedena reakcí s thionylchloridem v přítomnosti pyridinu jako katalyzátoru. Konjugace byla nakonec provedena jiným způsobem uvedeným níže.

C-(6-Brompyridin-3-yl)methylamin (**61**) byl připraven syntézou z 2-brom-5-methylpyridinu, jehož radikálovou bromací s N-bromsukcinimidem byl získán 2-brom-5-brommethylpyridin (Gucký *et al.*, 2013).

Substitucí nukleofilní v poloze C6- 9-cyklopentyl-2,6-dichlor-9*H*-purinu s C-(6-brompyridin-3-yl)methylaminem byla připravena látka **62**, jež byla dále podrobena tavení s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem, což vedlo ke vzniku látky **63** (Gucký *et al.*, 2013).

Následně bylo provedeno chránění aminoskupiny v poloze 4N-diaminocyklohexylové skupiny butoxykarbonylovou skupinou v bazickém prostředí (**64**) (Malínková, 2013).

Syntéza nové látky (**65**) biarylového charakteru byla provedena za podmínek Suzuki couplingu s pinakolesterem kyseliny 5-karboxythiofen-2-boronové za katalýzy Pd(dba)<sub>2</sub>.

Příprava polyaminového prekurzoru (**70**) probíhala procesem mnohastupňové syntézy. Výchozí látkou byl komerčně dostupný 4-methylaminobutan-1-ol. Tento aminoalkohol byl podroben reakci s ethylformiátem za vzniku N-(4-hydroxybutyl)formamidu, který byl následně redukován LiAlH<sub>4</sub> na látku **67**.

Látka **67** byla ochráněna diterc-butyl dikarbonátem a následně byla přidán chlorid kyseliny methansulfonové, což vedlo ke vzniku 4-(terc-

Butoxykarbonylmethylamino)butylester kyseliny methansulfonové (**69**). Konečný produkt (**70**) byl připraven reakcí látky **69** s putrescinem.

#### 4.2 Syntéza konjugátů

Pro konjugaci prekurzoru 2,6,9-trisubstituované purinové řady (**56**) s polyaminem (**70**) byly využity dva způsoby. První z nich spočíval v reakci látky **56**, **70** s dicyklohexylkarbodiimidem (DCC). Navázání polyaminu na purinový prekurzor se však nezdařilo z důvodu bočné reakce, při které vznikla jako produkt acylisourea. Tento výsledek byl zjištěn metodou HPLC-MS.

Další způsob vedl k úspěšné přípravě očekávaného konjugátu syntetickou metodou HATU couplingu. Činidlo HATU ((1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát) bylo použito z důvodu jeho schopnosti přeměny příslušné karboxylové kyseliny na aktivní ester. Pro vznik amidové vazby byla použita Hunigova báze (DIPEA). Konečnou reakcí byla substituce 2-amino-1-butanolu do polohy C2- purinového jádra konjugátu. Výsledným produktem byl analog roskovitinu v konjugaci s polyaminovým zbytkem.

## 5. Experimentální část

### 5.1 Materiál a metody

V průběhu experimentální práce byla čistota produktů i meziproductů sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck). Spektra nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR) byla získána na Bruker Avance AV 300 spektrometru při frekvenci 300 MHz. Látky byly rozpuštěny v DMSO- $d_6$  nebo chloroformu. Hodnoty chemického posunu jsou udány v jednotkách ppm. HPLC čistota byla provedena na RP-sloupci (150 mm, 4,6mm, 5mm, Microsorb C18, Varian). Vzorke byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanoseny na kolonu a oddělené složky byly vymyty lineárním methanolickým gradientem při průtoku 0,6 ml/min. Vyvíjecí sloučeniny byly detekovány pomocí skenování UV absorbance eluátu mezi 240 a 300 nm. Hodnoty teplot tání byly naměřeny na bodotávku Büchi B-540. Hmotnostní spektra byla získána měřením na hmotnostním spektrometru Waters ZMD 2000 s využitím pozitivní ionizace elektrosprejem. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve full scan módu v rozmezí m/z 50-800 Da.

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla jsou uvedeny v pracovních postupech experimentální části. 2,6-dichlorpurin byl jako jediný zakoupen od firmy OlChemim, rozpouštědla pak dále od firmy Lach-ner a všechny ostatní chemikálie od firmy Sigma Aldrich.

### 5.2 Syntéza prekurzorů

#### 5.2.1 Syntéza 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino)-methyl]-benzoové kyseliny

**2,6-dichlor-9-isopropyl-9H-purin** (Gucký *et al.*, 2013)

2,6-dichlorpurin (30 mmol) byl v prostředí dusíkové atmosféry rozpuštěn ve směsi tetrahydrofuranu (120 ml) a isopropanolu (60 mmol). Poté byl přidán trifenyfosfin (36 mmol) a následně po kapkách DIAD (36 mmol). Během přikapávání diisopropyl-

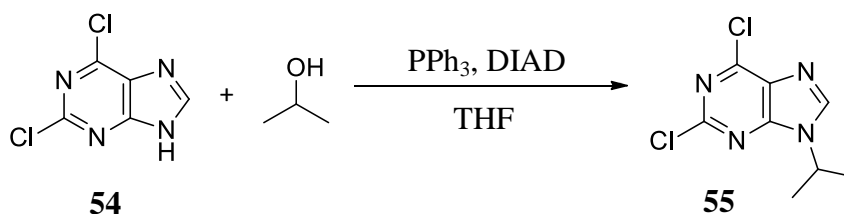
azodikarboxylátu byla teplota reakční směsi udržována v rozmezí 20-25 °C. Směs byla míchána po dobu dvou hodin při teplotě 20-25 °C. Ukončení reakce bylo potvrzeno pomocí TLC (mobilní fáze: ethylacetát:toluen, 1:1). Reakční směs byla vakuově odpařena na RVO a získaný hustý žlutý odparek byl rozpuštěn ve vroucím toluenu (ml). Poté byl ponechán volné krystalizaci po dobu 2 hodin a dále při teplotě -18 °C po dobu 16 hodin. Směs byla přes noc ponechána ke krystalizaci v mrazáku (-18 °C). Vyloučený trifenyfosfinoxid byl odsát na fritě a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl krystalován z 50 ml ethanolu. Vyloučený krystalický produkt byl odsát na fritě, promyt 2x5 ml ledového ethanolu a vysušen v sušárně (60 °C) do konstantní hmotnosti.

Výtěžek: 65%

Sumární vzorec: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, Mr = 231,08.

Elementární analýza: Vypočteno: 41,58 % C, 3,49 % H, 24,25 % N, Nalezeno: 41,22 % C, 3,75 % H, 23,86 % N.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1,49(d, J=5,91, 6H, 2xCH<sub>3</sub>); 4,63-4,72(m, CH, CH<sub>2</sub>); 7,42(d, J=7,47, 2H, ArH); 7,88(d J=7,47, 2H, ArH); 8,31(s 1H, CH); 8,88(t J= 7,53, 1H, NH).



#### 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino)-methyl]-benzoová kyselina

Směs 2,6-dichlor-9-isopropyl-9H-purinu (3,00 mmol), 4-aminomethylbenzoové kyseliny (3,00 mmol) a N,N,-diisopropyl-N-ethylaminu (6,00 mmol) byla za stálého míchání zahřívána v tlakové ampuli po dobu 240 minut. Po kontrole reakční směsi pomocí tenkovrstevné chromatografie v soustavě toluen-kyselina octová (3:1) byla reakční směs odpařena na RVO a odparek byl suspendován ve vodě (25 ml) a přidavkem kyseliny octové bylo upraveno pH na hodnotu 6-7. Suspenze byla extrahována 3x 25 ml ethylacetátu, spojené organické fáze byly protřepány solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO. Surový produkt byl krystalován z ethanolu.

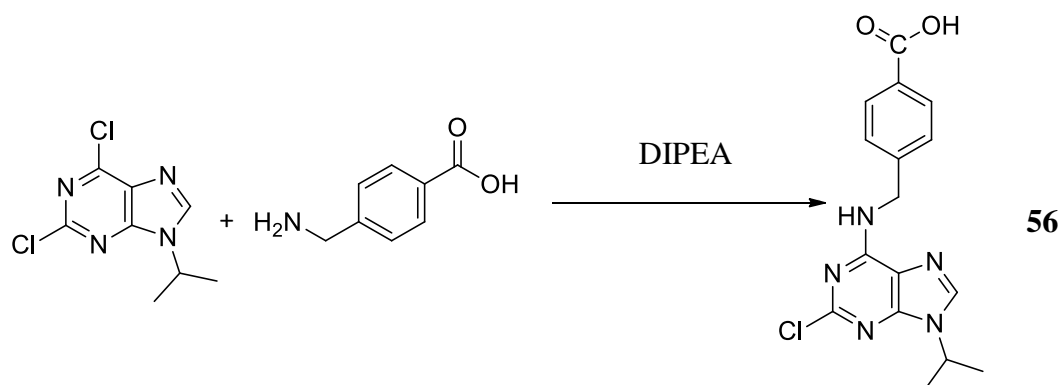
Výtěžek: 93%

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, Mr = 345,78.

Elementární analýza: Vypočteno: 55,58 % C, 4,66 % H, 20,25 % N, Nalezeno: 55,52 % C, 4,82 % H, 19,75 % N.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1,49(d, J=5,91, 6H, 2xCH<sub>3</sub>); 4,61-4,72 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>); 7,42(d, J=7,47, 2H, ArH); 7,88(d, J=7,47, 2H, ArH); 8,31(s, 1H, CH); 8,88(t, J=5,27, 1H, NH).

HPLC-MS (ESI-): 344,8 (98,2%).



### 5.2.2 Syntéza 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino)-methyl]-benzoyl chloridu

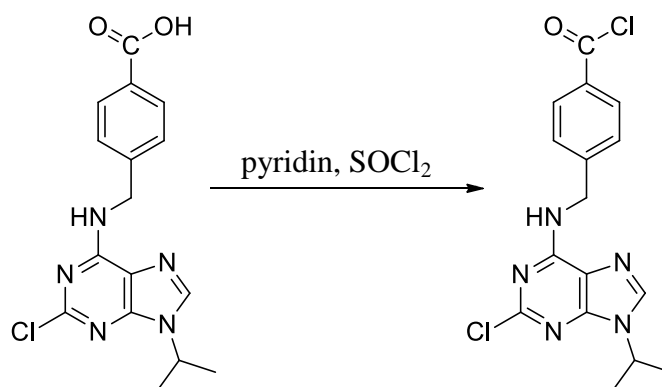
Produkt z předchozího reakčního kroku (2,89 mmol) byl míchán s thionylchloridem (14,45 mmol) v 1,2-dichlorethanu (10 ml) v tlakové ampuli při 80°C po dobu 4 hodin. Pro katalýzu reakce byla přidána kapka pyridinu. Po ukončení reakce a ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena na RVO, odparek rozdělen mezi vodu (25 ml) a dichlormetan (25 ml). Organická fáze byla promyta vodou, solankou, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena na RVO. Surový produkt byl použit do další reakce bez čištění.

Výtěžek: 75%

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O, Mr = 364,23.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,59(d, J=6,66, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 4,83 (sept, J=6,66, 1H, CH); 4,96 (s(br), 2H, CH<sub>2</sub>); 7,55(d, J=8,28, 2H, ArH); 7,87(s, 1H, CH); 8,11(d, J=8,28, 2H, ArH); 8,68 (s(br), 1H, NH).

HPLC-MS (ESI+): 365,29 (96,1%).



57

### 5.2.3 Syntéza 5-(5-[[2-(4-tert-Butoxycarbonylamino-cyklohexylamino)-9-cyclopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl]-pyridin-2-yl)-thiofen-2-karboxylové kyseliny

**2,6-Dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (Mitsunobu alkylace):** (Dreyer *et al.*, 2001)  
K roztoku 2,6-dichlorpurinu (60,00 mmol) a cyklopentanolu (120,00 mmol) v THF (240 ml) byl pod dusíkovou atmosférou přidán trifenylfosfin (72 mmol) a po rozpuštění všech komponent byl v přítomnosti argonu opatrně přikapáván DIAD (72 mmol). V průběhu reakce byla udržována teplota reakční směsi v okolí 10 °C. Byla provedena TLC (mobilní fáze: ethylacetát : toluen, 1:1). Reakce probíhala po dobu 4 hodin. Po ukončení reakce byla směs vakuově odpařena a získaný žlutý odparek byl rozpuštěn ve 200 ml vroucího toluenu. Směs byla ochlazena na laboratorní teplotu, naočkována trifenylfosfinoxidem a ponechána do dalšího dne ke krystalizaci v mrazáku (-18 °C). Další den byl produkt zbaven pevné části (trifenylfosfinoxidu). Filtrát byl odpařen na RVO a rozpuštěn ve 150 ml vroucího etanolu. Poté byla směs ochlazena na laboratorní teplotu, naočkována malým množstvím dříve nasyntetizované frakce 2,6-dichlor-9-cyklopentylpurinu a vložena ke krystalizaci do mrazáku. Další den byl produkt odsán na fritě a sušen ve vakuové sušárně do konstantní hmotnosti.

Výtěžek: 36%, t. t.: 118-120 °C.

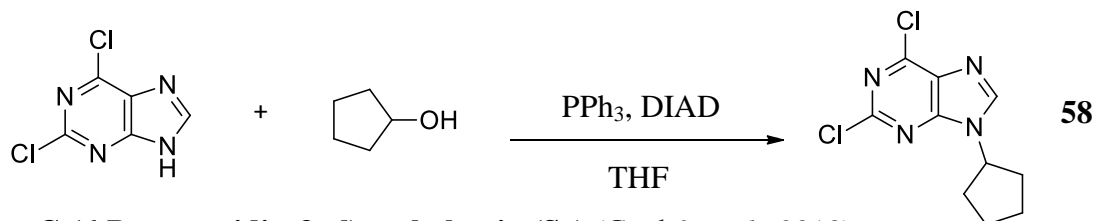
Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, Mr = 257,12.



Elementární analýza: Vypočteno: C, 46,71; H, 3,92; N, 21,79. Nalezeno: C, 46,95; H, 3,81; N, 21,70.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1,64-1,69(m, 2H); 1,81-1,96(m, 4H); 2,09-2,15(m, 2H); 4,92(qui, J=7,53, 1H, CH); 8,82(s, 1H, CH).

HPLC-MS (ESI+): 288,10 (99,6%).



2-Brom-5-methyl-pyridin (70,00 mmol) a N-bromsukcinimid (80,00 mmol) byly rozpuštěny v 1,2-dichlorethanu (150 ml) a ke směsi byl přidán 2,2'-azobis(2-ethylpropionitril) (1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za stálého míchání při teplotě 85 °C, po 15 minutách byla přidána další část 2,2'-azobis(2-methylpropionitrilu) (1,50 mmol) a reakční směs byla zahřívána při teplotě 85°C dalších 15 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs ponechána stání po dobu 2 hodin při teplotě 5°C a vyloučená sraženina byla zfiltrována a promyta 1,2-dichlorethanem. Filtrát byl za sníženého tlaku odpařen a surový reakční produkt byl použit do dalšího reakčního kroku bez dalšího čištění. Surový 2-brom-5-brommethyl-pyridin byl rozpuštěn v chlorformu (100 ml) a k roztoku byl přidán urotropin (70,00 mmol). Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 16 hodin. Vyloučená sraženina byla odsáta, promyta chloroformem a vysušena na vzduchu. Surová urotropinová sůl byla zahřívána při teplotě 100 °C pod zpětným chladičem ve směsi koncentrovaného hydroxidu amonného (12 ml) a vody (80 ml) po dobu 90 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 40% roztok formaldehydu (5,00 ml) a vyloučená sraženina byla zfiltrována, promyta ledovou vodou a vysušena v exsikátoru. Surový produkt byl krystalován z ethanolu.

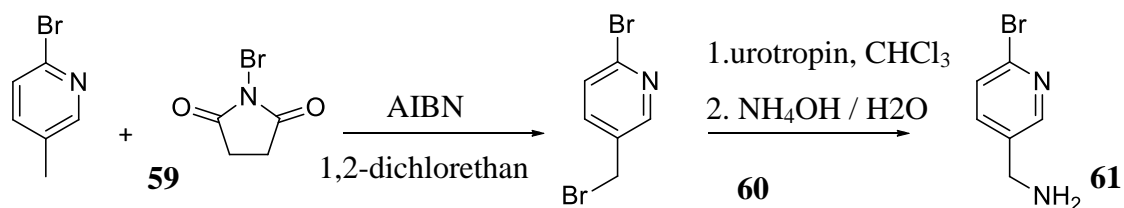
Výtěžek: 40%, t. t. 105-106°C.

Sumární vzorec: C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>BrN<sub>2</sub>, Mr = 187,04.

Elementární analýza: Vypočteno: C, 38,53; H, 3,77; N, 14,98. Nalezeno: C, 38,22; H, 3,72; N, 14,71.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 4,04(t, J=5,67, 2H, CH $_2$ ); 7,71(d, J=8,19, 1H, ArH); 7,95(dd, J=8,19, J'=1,95, 1H, ArH); 8,51(d, J=1,95, 1H, ArH), 8,74(s (br), 2H, NH $_2$ ).

HPLC-MS (ESI+): 188,02 (97,2%).



**(6-Bromopyridin-3-ylmethyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-amin** ( $S_N2$  v poloze 6-) (Gucký *et al.*, 2013)

K suspenzi 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purinu (19,44 mmol) ve směsi *n*-propanolu (53 ml) a *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (38,88 mmol) byl přidán C-(6-bromopyridin-3-yl)methylamin (20,41 mmol). Suspenze byla probublána argonem a za stálého míchání zahřívána při teplotě 120 °C v uzavřené tlakové ampuli. Po dvou hodinách byla provedena TLC a reakce byla ukončena. Jako mobilní fáze pro TLC byla použita směs chloroform : methanol : NH $_4$ OH, 4 : 1 : 0,05. Produkt byl ochlazen na laboratorní teplotu a uložen na 48 hodin do lednice (5°C). Vyloučená sraženina byla odsáta na fritě a promyta malým množstvím *n*-propanolu. Pevná část byla rozpuštěna v methanolu a opět byla provedena kontrola pomocí TLC (mobilní fáze: methanol : chloroform, 1 : 9). Filtrát byl vakuově odpařen a oddělen ve směsi dichlormethanu (50 ml) a vody (50 ml). Vodná fáze byla následně extrahována 2x dichlormethanem (50 ml) a organická fáze byla protřepána 1x nasyceným vodným roztokem NaCl (50 ml), vysušena malým množstvím Na $_2$ SO $_4$  a odpařena na RVO.

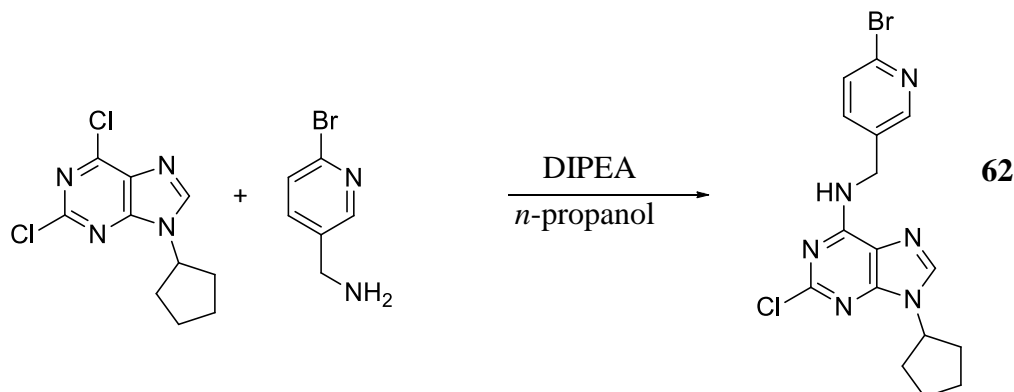
Výtěžek 71%, t. t.: 135-137 °C.

Sumární vzorec: C $_{21}$ H $_{20}$ ClN $_5$ O, Mr = 393,87.

Elementární analýza: Vypočteno: C, 64,04; H, 5,12; N, 17,78. Nalezeno: C, 64,25; H, 4,98; N, 17,67.

$^1\text{H}$  NMR (CDCl $_3$ ): 1,72-1,93(m, 6H), 2,22-2,28(m, 2H), 4,85-4,92(m, 3H, CH, CH $_2$ ), 6,65(d, J=3,33, 1H, ArH), 7,40(m, 2H, ArH), 7,48(t, J=3,33, 1H, ArH), 7,64-7,69(m, 3H, ArH, CH).

HPLC-MS (ESI+): 394 (97,4%).



**N<sup>2</sup>-(4-Aminocyklohexyl)-N<sup>6</sup>-(6-bromopyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin (S<sub>N</sub>2 v poloze 2)** (Gucký *et al.*, 2013)

Práškový (6-bromopyridin-3-ylmethyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-amin (4,56 mmol) byl s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem (91,24 mmol) taven při 160 °C v uzavřené tlakové ampuli. Reakce probíhala za stálého míchání v argonové atmosféře po dobu 180 minut. Po ochlazení na 100 °C bylo k reakční směsi přidáno 50 ml vody a získaná suspenze byla extrahována 3x ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze byly pročištěny nasyceným vodným roztokem NaCl (50 ml), vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu a následně byl přidán diethylether k získání krystalické hmoty, jež byla následně zfiltrována a vysušena při teplotě 80 °C. Produkt bylo nutné přečistit na koloně z důvodu přítomnosti vedlejších produktů ve směsi. Mobilní fází byla směs methanol:chloroform:NH<sub>4</sub>OH, 1:4:0,05.

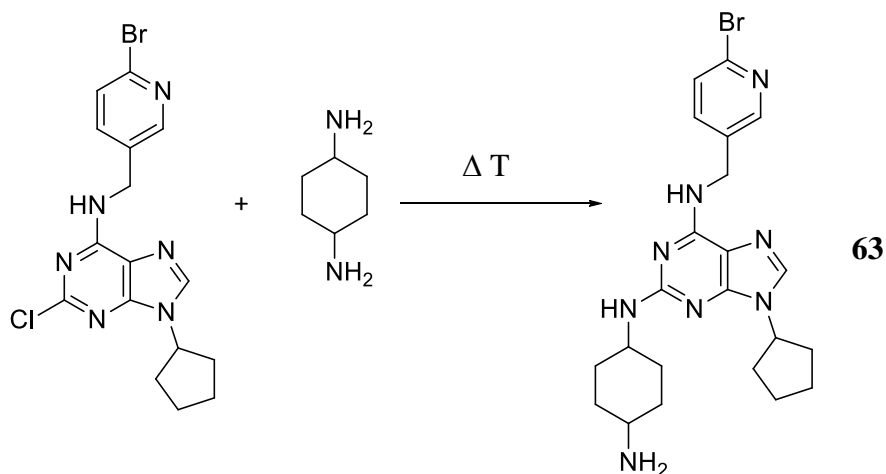
Výtěžek: 35%, t. t.: 178-179 °C.

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClBrN<sub>6</sub>, Mr = 407,70.

Elementární analýza: Vypočteno: C, 47,14; H, 3,96; N, 20,61. Nalezeno: C, 47,35; H, 3,88; N, 20,48.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1,64-1,69(m, 2H), 1,81-1,96(m, 4H); 2,09-2,15(m, 2H); 4,61 (s(br), 2H, CH<sub>2</sub>), 4,77(qui, J=7,20, 1H, CH), 7,59(d, J=8,19, 1H, ArH); 7,70(d, J=8,19, 1H, ArH), 8,26(s, 1H, CH), 8,38(s, 1H, ArH), 8,82 (s(br), 1H, NH).

HPLC-MS (ESI<sup>+</sup>): 409 (98,5%).



**Terc-butylester kyseliny (4-{6-[(6-bromopyridin-3-ylmethyl)amino]-9-cyklopentyl-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexyl)-karbamové (Malínková, 2013)**

Látky  $N^2$ -(4-Aminocyklohexyl)- $N^6$ -(6-bromopyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin (1,11 mmol) a hydrogenuhlíčan sodný (1,33mmol) byly rozpuštěny v THF (57 ml) a ve vodě (17 ml). Poté byl postupně přidáván di-terc-butyl dikarbonát (1,33 mmol). Směs se nechala míchat 120 minut, poté byla provedena TLC (mobilní fáze: chloroform:methanol: $NH_4OH$ , 4 : 1 : 0,05) a reakce byla ukončena. Produkt byl odpařen na RVO. Následovala extrakce za použití 2x 20 ml dichlormethanu a 1x 10 ml destilované vody. Organické fáze byly protřepány 1x nasyceným vodným roztokem NaCl (10 ml), vysušeny malým množstvím  $Na_2SO_4$  a odpařeny na RVO.

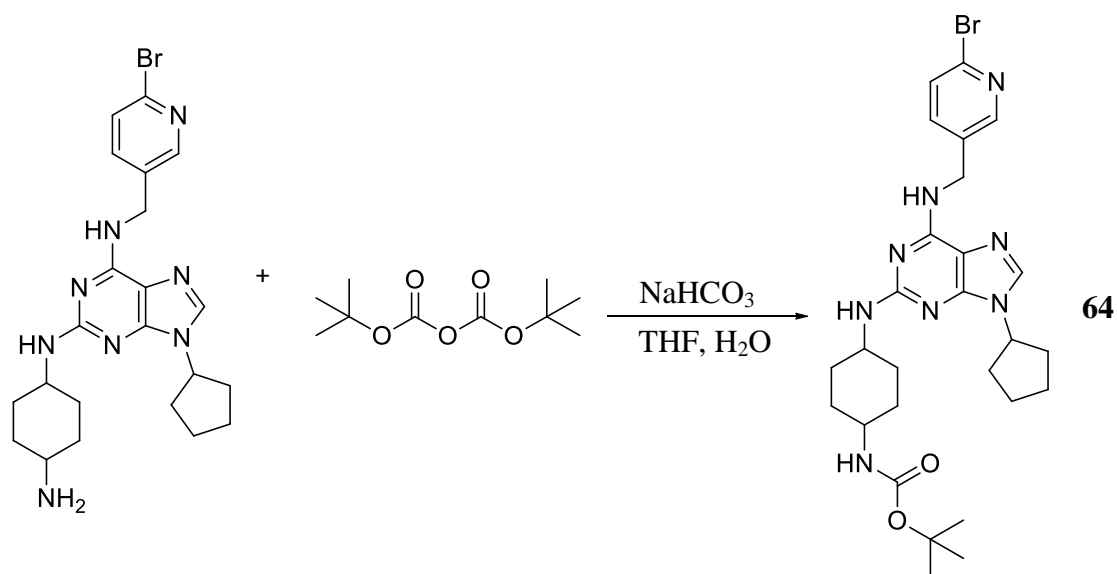
Výtěžek: 95%

Sumární vzorec:  $C_{27}H_{37}BrN_8O_2$ , Mr = 585,54.

Elementární analýza: Vypočteno: 55,38 % C, 6,37 % H, 19,14 % N, Nalezeno: 55,01 % C, 6,52 % H, 18,64 % N.

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) : 1,25-1,45 (m, 17H); 1,74-1,76 (m, 3H); 1,93-2,21 (m, 12H); 3,43 (s, 2H); 3,65 (s, 1H); 4,41 (s, 1H); 4,7 (s, 4H); 6,17 (s, 1H); 7,39-7,58 (m, 3H); 8,39 (s, 1H).

HPLC (91%), MS[M+ $H^+$ ]=587,33.



**5-(5-{[2-(4-tert-Butoxykarbonylamino-cyklohexylamino)-9-cyclopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-thiofen-2-karboxylová kyselina**

**(Suzuki coupling)**

Produkt (1,14 mmol) z předchozího reakčního kroku byl spolu s pinakolesterem kyseliny 5-karboxythiofen-2-boronové (3,42 mmol), uhličitanem draselným (5,7 mmol), trifenylyfosfinem (0,57 mmol) a Pd(dba)<sub>2</sub> (0,057 mmol) přidán do argonem probubláné směsi ethanolu a vody (2:1, v/v, 32 ml). Reakce probíhala v tlakové ampuli při teplotě 120 °C v čase 72 hodin. Následovala neutralizace 1M HCl (malé množství, po kapkách). Dále byla suspenze zředěna vodou (50 ml) a ještě před extrakcí ethylacetátem (2x 50 ml) bylo přidáno malé množství kyseliny octové (0,650 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (50 ml), vysušeny malým množstvím Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny na RVO.

Produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: směs chloroform:methanol, 4 : 1).

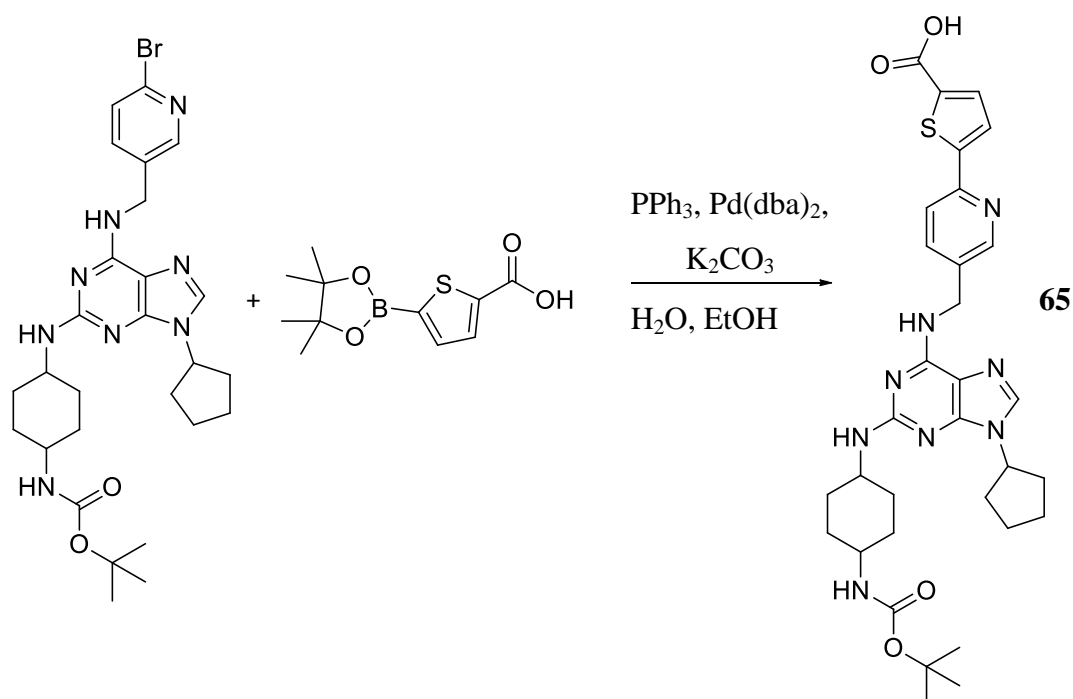
Výtěžek: 65%, t. t.: 201-203 °C.

Sumární vzorec: C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>S, Mr = 632,78.

Elementární analýza: Vypočteno: 60,74 % C, 6,37 % H, 17,71 % N, Nalezeno: 61,10 % C, 6,14 % H, 17,22 % N.

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 1,26-1,36 (m, 4H); 1,46 (s, 9H, 3xCH $_3$ ); 1,74-1,77 (m, 2H); 1,81-1,99 (m, 8H); 2,01-2,21 (m, 2H); 3,43 (sex, J=6,39, 1H, CH); 4,43 (sex, J=5,29, 1H, CH); 4,57 (qui, J=5,37, 1H, CH); 4,71 (d, J=5,10, 2H, CH $_2$ ); 6,21 (d, J=6,39, 1H, NH); 7,39-7,41 (m, 2H, ArH); 7,48 (s, 1H, ArH); 7,54 (d, J=7,01, 1H, ArH); 7,67 (d, J=7,01, 1H, ArH); 8,27 (t, J=5,37, 1H, NH); 8,38 (s, 1H, CH).

HPLC-MS (ESI $^+$ ): 634,10 (98 %).



#### 5.2.4 Syntéza polyaminů

##### 4-Methylaminobutan-1-ol (Muth *et al.*, 2013)

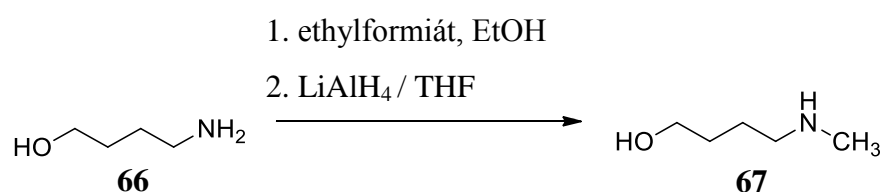
K roztoku 4-aminobutanolu (34,32 mmol) a ethanolu (35,5 ml) byl za intenzivního míchání přidán ethylformiát (53,60 mmol). Reakční směs byla míchána v tlakové ampuli (80° C) v atmosféře dusíku po dobu 18 hodin. Roztok byl po ochlazení na laboratorní teplotu odpařen na RVO a surový formamid byl použit do dalšího reakčního kroku bez purifikace. Reakční směs byla rozpuštěna v THF (17,75 ml) a opatrně přikapávána k předem připravené suspenzi LiAlH $_4$  (106,91 mmol) v THF (36 ml). Poté byla reakční směs dána pod reflux a průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: chloroform : ethanol, 4 : 1) a  $^1\text{H}$  NMR (CDCl $_3$ ). Po dvou hodinách

výchozí látka zreagovala a do vychlazené reakční směsi bylo za stálého míchání přidáno 2,94 ml H<sub>2</sub>O, následně 2,94 ml 4M NaOH a nakonec 8,86 ml H<sub>2</sub>O. Vzniklá sraženina byla odstraněna filtrací a filtrát byl zakoncentrován na RVO. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu, vysušen bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrován a vakuově odpařen. Konečný produkt byl olejovitého charakteru.

Výtěžek: 71%

Sumární vzorec: C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>NO, Mr = 103,16.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,50–1,75 (m, 5H, 2xCH<sub>2</sub>, OH); 2,43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,62 (t, J=5,70, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,45 (s(br), 1H, NH); 3,57 (t, J= 5,40, 2H, CH<sub>2</sub>).



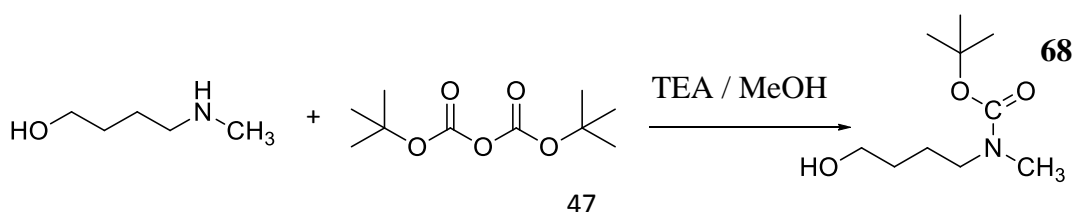
#### Terc-butylester kyseliny (4-hydroxybutyl)methylkarbamové (Muth *et al.*, 2013)

Produkt z předchozího reakčního kroku (24,23 mmol) byl převeden do roztoku s triethylaminem a methanolem (1:7, v/v, 90,58 ml) a směs byla míchána 10 minut při teplotě 0 °C. Během dalších deseti minut byl po kapkách přidán roztok diterc-butyl dikarbonátu (36,33 mmol) v methanolu (18 ml). Směs byla hodinu míchána v atmosféře dusíku. Poté se teplota nechala vystoupat na laboratorní teplotu a směs byla míchána přes noc. Roztok byl vakuově odpařen, rozpuštěn v dichlorethanu a promyt destilovanou vodou. Organická fáze byla oddělena, vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zakoncentrována na RVO. Byl získán olejovitý produkt.

Výtěžek: 87%

Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>, Mr = 203,28.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,53 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); 1,53-1,59 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,25 (t, J= 4,50, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,67-3,72 (q, J=4,92, 2H, CH<sub>2</sub>-N).



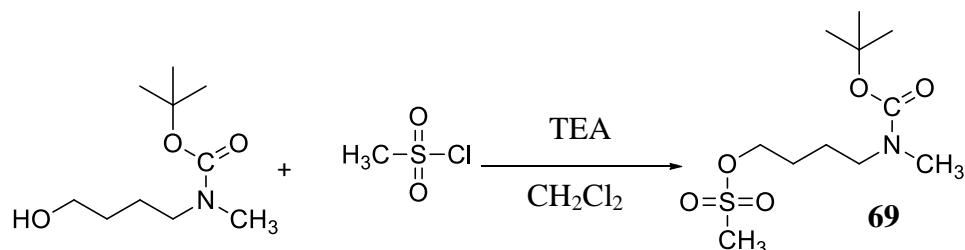
**4-(terc-Butoxykarbonylmethylamino)butylester kyseliny methansulfonové (Muth *et al.*, 2013)**

Ke směsi Terc-butylesteru kyseliny (4-hydroxybutyl)methylkarbamové (20,76 mmol) a triethylaminu (15,50 ml) v dichlorethanu (60 ml) byl po kapkách při teplotě 0 °C přidán chlorid kyseliny methansulfonové (132,45 mmol). Reakční směs byla míchána v atmosféře dusíku při teplotě 0 °C po dobu jedné hodiny a po vystoupení teploty na laboratorní teplotu byl roztok míchán přes noc. Poté byla směs opět ochlazena na 0 °C a následně byl po kapkách za intenzivního míchání přidán 1M NaOH (500 ml). Organická fáze byla oddělena a vytřepána v destilované vodě (250 ml). Následně bylo provedeno další dělení, sušení bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zahuštění na RVO. Olejovitý produkt byl použit do dalšího reakčního kroku bez purifikace.

Výtěžek: 78%

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>S, Mr = 281,37.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45 (s, 9H, 3xCH<sub>3</sub>); 1,59-1,79 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,26 (t, J=6,75, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,26(t, J=6,03, 2H, CH<sub>2</sub>).



**Terc-butylester kyseliny [4-(4-aminobutylamino)butyl]-methyl-karbamové (Muth *et al.*, 2013)**

Putrescin (21,55 mmol) byl rozpuštěn ve směsi acetonitrilu (40 ml) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21,48 mmol). Reakční směs byla míchána v dusíkové atmosféře. Produkt z předchozího reakčního kroku (4,30 mmol) byl rozpuštěn v acetonitrilu (12 ml) a během třiceti minut byl přidán do reakční směsi po kapkách. Reakční směs byla převedena do tlakové ampule, kde byla míchána přes noc při teplotě 95 °C. Poté byla směs ochlazena, pevný K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> byl odfiltrován a zbytek byl vakuově odpařen. Odparek byl rozpuštěn v dichlorethanu (40 ml) a 6krát vytřepán nasyceným vodným roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pro odstranění nezreagovaného putrescinu. Organická vrstva byla vysušena bezvodým

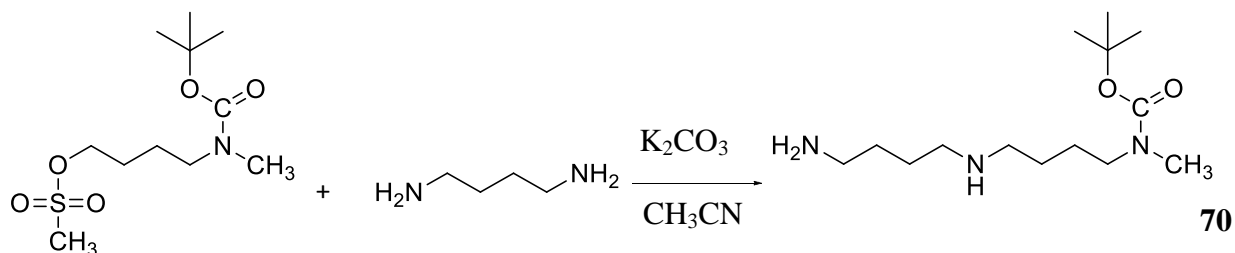


Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zahuštěna na RVO. Vznikl poměrně čistý olejovitý produkt, který nebylo nutno dále přečišťovat.

Výtěžek: 65%

Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Mr = 273,41.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1,45-1,49 (m, 17H, 3x CH<sub>3</sub>, 4xCH<sub>2</sub>); 2,61(t, J=6, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,21 (t, 2H, NH<sub>2</sub>).



### 5.3 Syntéza konjugátů

**Terc-butyl ester kyseliny [4-(4-{4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino) methyl]-benzoylamino}-butylamino)-butyl]-methyl-karbamové**

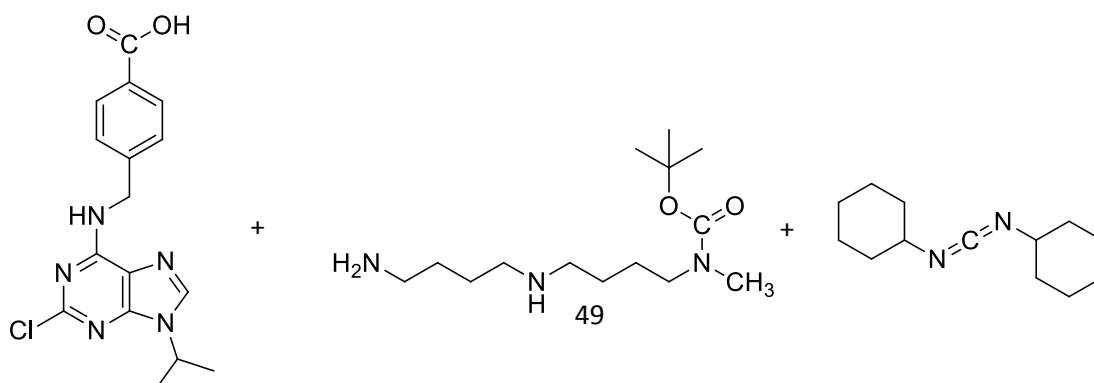
#### S DCC

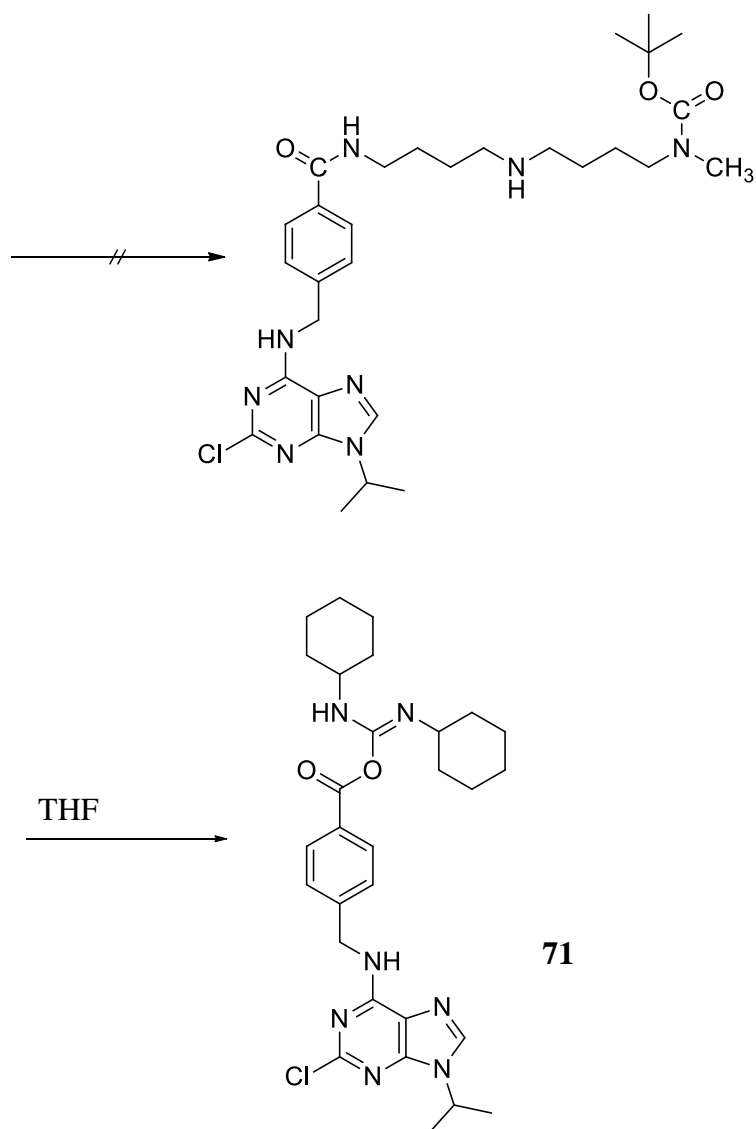
Směs polyaminu (0,91 mmol), látky **56** (0,76 mmol) a dicyklohexylkarbodiimidu (0,91 mmol) byla míchána v prostředí suchého tetrahydrofuranu (5 ml). Konec reakce byl zaznamenán pomocí TLC (mobilní fáze: směs chloroform:methanol, 9:1). Produkt byl promyt vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (20 ml), DCM (20 ml), destilovanou vodou (20 ml) a vodným roztokem NaCl. Následně byl produkt vysušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a vakuově odpařen.

Výtěžek: 85%

Sumární vzorec: C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>, Mr = 552,11.

HPLC-MS (ESI<sup>+</sup>): 553,10 (99,5%).





### HATU coupling

Směs látek **56** (0,43 mmol), HATU kondenzačního činidla (0,52 mmol), polyaminu (0,43 mmol) a diisopropylethylaminu (1,29 mmol) byla míchána v prostředí suchého DMF (5 ml). Reakce byla provedena v tlakové ampuli při teplotě 50 °C a její průběh byl kontrolován metodou TLC (mobilní fáze: směs chloroform : methanol, 9 : 1). Reakční čas byl 4 hodiny. Poté byla směs zředěna destilovanou vodou (20 ml), extrahována 3krát ethylacetátem (20 ml) a 1krát nasyceným vodným roztokem NaCl (20 ml). Nakonec byla směs vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení: chloroform – methanol 4:1.

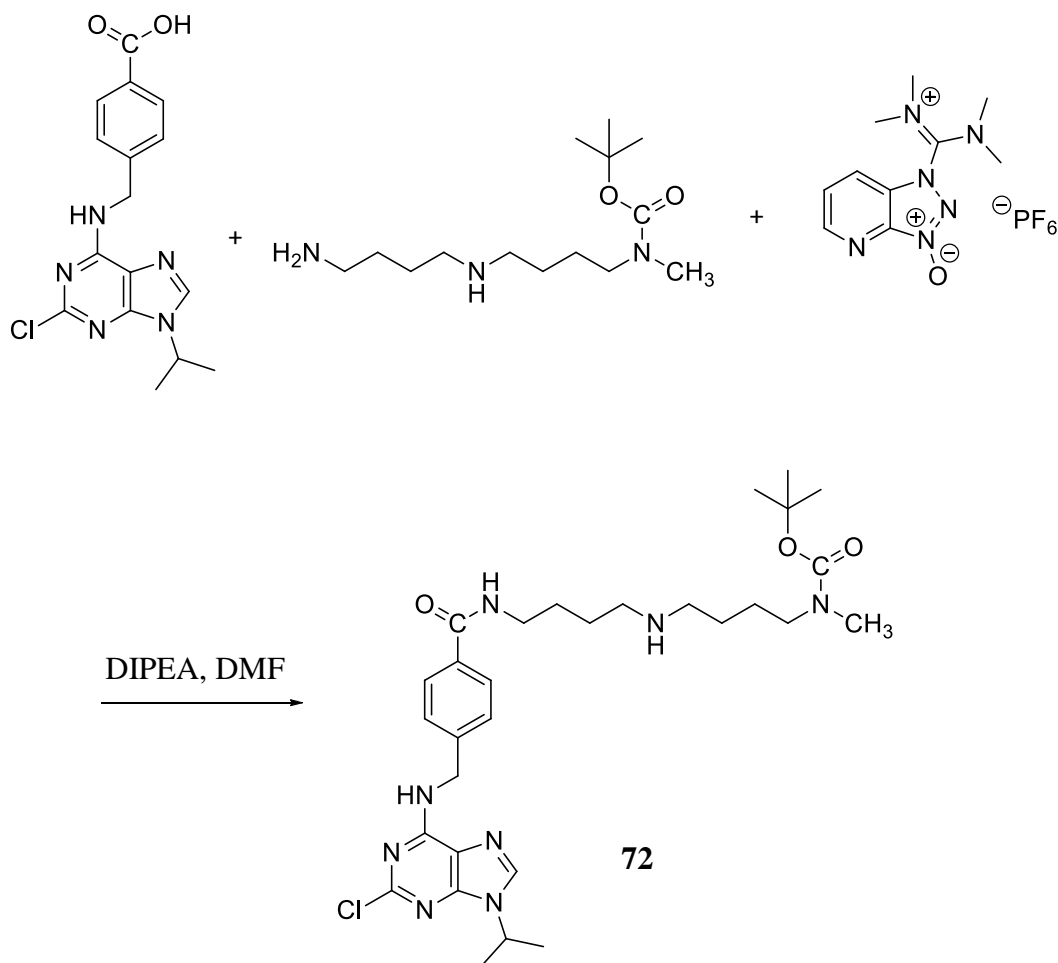
Výtěžek: 35%

Sumární vzorec:  $C_{30}H_{45}ClN_8O_3$ , Mr = 601,18.

Elementární analýza: Vypočteno: 59,94 % C, 7,54 % H, 18,64 % N, Nalezeno: 59,68 % C, 7,21 % H, 18,23 % N.

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1,42(s, 9H, 3x $CH_3$ ); 1,63(d, J=6,45, 6H, 2x $CH_3$ ), 1,66-1,70(m, 4H, 2x $CH_2$ ); 1,71-1,79(m, 4H, 2x $CH_2$ ); 2,82(s, 3H,  $CH_3$ ); 3,01-3,12(m, 4H, 2x $CH_2$ ); 3,21(t, J=5,73, 2H,  $CH_2$ ); 3,39(q, J=5,25, 2H,  $CH_2$ ); 4,80 (s(br), 2H,  $CH_2$ ); 4,89(sept, J=6,45, 1H, CH); 7,30(d, J=7,21, 2H, ArH); 7,63(d, J=7,21, 2H, ArH); 8,07 (s(br), 2H, 2xNH), 8,29(s, 1H, CH).

HPLC-MS (ESI+): 602,25 (98%).



**Terc-butylester kyseliny {4-[4-(4-{[2-((R)-1-hydroxymethyl-propylamino)-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-benzoylamino)-butylamino]-butyl}-methyl-karbamové**

Produkt z předchozí reakce (0,1497 mmol) byl vložen do tlakové ampule. Poté byl přidán 2-amino-1-butanol (2,99 mmol) a 2 ml butanolu. Reakční směs byla míchána při teplotě 160 °C po dobu čtyř hodin. Ukončení reakce bylo zaznamenáno pomocí TLC (mobilní fáze: směs chloroform : methanol, 4 : 1). Reakční směs byla zředěna 10 ml destilovanou vodou a vytřepána 3krát 10 ml ethylacetátem. Následně byla směs vytřepána nasyceným vodným roztokem NaCl a nakonec vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Suorvý produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází o složení: chloroform – methanol 4:1

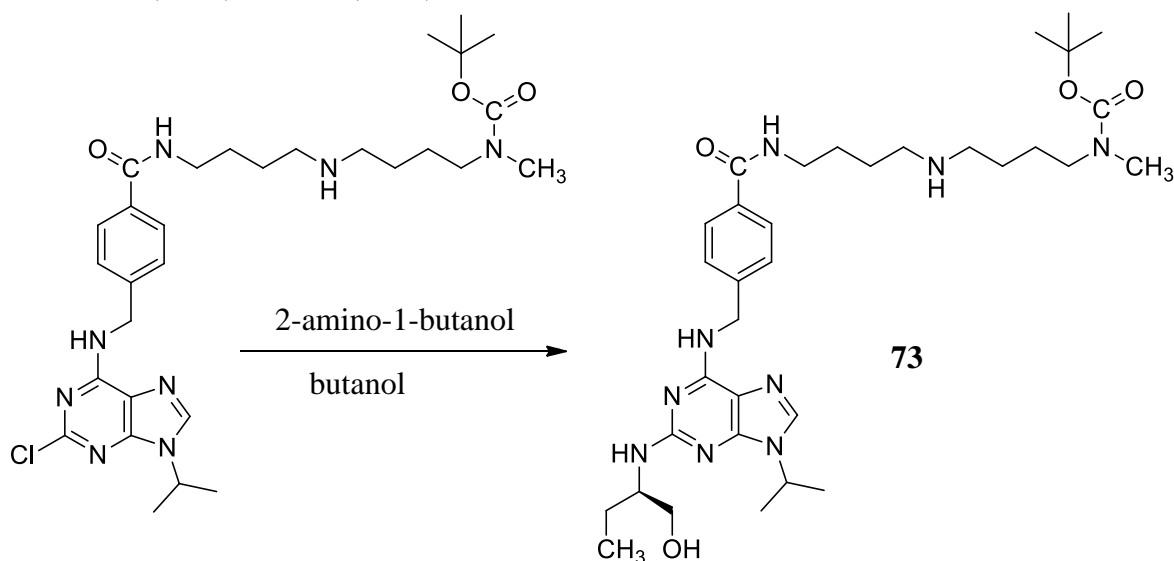
Výtěžek: 92%

Sumární vzorec: C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>N<sub>9</sub>O<sub>4</sub>, Mr = 653,86.

Elementární analýza: Vypočteno: 62,45% C, 8,48% H, 19,28% N, Nalezeno: 62,01% C, 8,11% H, 19,64% N.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0,96 (t, J=6,30, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,33-1,50 (m, 17H, 3xCH<sub>3</sub>, 4xCH<sub>2</sub>); 1,55-1,69 (m, 8H, 2x CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>); 2,71-2,77 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>); 2,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,20 (t, J=5,67, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,45 (sex, J=5,67, 1H, CH); 4,79-4,86 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>); 7,42 (d, J=8,19, 2H, ArH); 7,75 (d, J=8,19, 2H, ArH); 7,81 (s, 1H, CH); 8,07 (s(br), 2H, 2xNH).

HPLC-MS (ESI+): 654,75 (96 %).



## 6. Závěr

Cílem této práce byla syntéza konjugátů vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz 2,6,9-trisubstituované purinové řady s polyaminy. Bylo připraveno celkem šest nových látek (**56**, **57**, **65**, **71**, **72**, **73**). Látka **56** byla použita jako standard pro optimalizaci reakčních kroků při konjugačních reakcích s polyaminem. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším způsobem spojení purinového prekurzoru s polyaminem je metoda HATU couplingu. 4-[(2-Chlor-9-isopropyl-9*H*-purin-6-ylamino)-methyl]-benzoyl chlorid (**57**) a 5-(5-{[2-(4-tert-butoxycarbonylamino-cyklohexylamino)-9-cyclopentyl-9*H*-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-thiofen-2-karboxylová kyselina (**65**) byly připraveny jako další prekurzory pro nové konjugáty, jež budou předmětem zájmu v následujících studiích.

## 7. Použitá literatura

- Anderson R. G., Kamen B. A., Rothberg K. G., Lacey S. W. (1992): Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, **255**, 410-411.
- Bachrach U., Seiler N. (1981): Formation of acetylpolyamines and putrescine from spermidine by normal and transformed chick embryo fibroblasts. *Cancer Res.*, **41**, 1205-1208.
- Barret J., Kruczynski A., Vispe S., Annereau J., Brel V., Guminski Y., Delcros J. G., Lansiaux A., Guilbaud N., Imbert T., Bailly C. (2008): F14512, a potent antitumor agent targeting topoisomerase II vectored into cancer cells via the polyamine transport system. *Cancer Res.*, **68**, 9845-9853.
- Bártek J., Bártková J., Lukas J. (1996): The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 805-814.
- Belting M., Mani K., Jonsson M., Cheng F., Sandgren S., Jonsson S., Ding K., Delcros J. G., Fransson L. (2003): Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **278**, 47181-47189.
- Bettayeb K., Sallam H., Ferandin Y., Popowycz F., Fournet G., Hassan M., Echalié A., Bernard P., Endicott J., Joseph B., Meijer L. (2008): N-&N, a new class of cell death inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 2713-2724.
- Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J. A., Galons H., Meijer L. (2008): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, **27**, 5797-5807.
- Blagosklonny M. V. (2004): Flavopiridol, an inhibitor of transcription: implications, problems and solutions. *Cell Cycle*, **3**, 1537-1542.
- Bojanowski K., Nishio K., Fukuda M., Larsen A. K., Saijo N. (1994): Effect of suramin on p34cdc2 kinase in vitro and in extracts from human H69 cells: evidence for a double mechanism of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1574-1580.
- Casero R. A., Marton L. J. (2007): Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 373-390.
- Cipolla B., Bansard J. Y., Moulinoux J. P. (2006): Phase I study of a novel polyamine free formula as nutrition therapy of metastatic hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients. *Urology*, **68**, 196-197.
- Coradini D., Pellizzaro C., Miglierini G., Daidone M. G., Perbellini A. (1999): Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *Int. J. Cancer*, **81**, 411-416.
- Cullis P., Green R., Merson-Davies L., Travis N. (1999): Probing the mechanism of transport and compartmentalisation of polyamines in mammalian cells. *Chem. Biol.*, **6**, 717-729.
- Cunha A. S., Lima E. L. S., Pinto A.C., Esteves-Souza A., Echevarria A., Camara C. A., Vargas M. D., Torres J. C. (2006): Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on DNA-topoisomerases I and II-a. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**, 439-442.
- Čapek P., Otmar M., Masojídková M., Votruba I., Holý A. (2003): A facile synthesis of 9-deaza analogue of olomoucine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **68**, 779-791. Meijer L., Battayeb K., Galons H., Demange L., Oumata N., inventors; Perharidines as CDK inhibitors. WO 2009/034411. 2009 Mar 19.
- Dallavalle S., Giannini D., Alloatti D., Casati A., Marastoni E., Musso L., Merlini L., Morini G., Penco S., Pisano C., Tinelli S., Cesare M. D., Beretta G. L., Zunino F. (2006): Synthesis and cytotoxic activity of polyamine analogues of camptothecin. *J. Med. Chem.*, **49**, 5177-86.
- Delcros J. G., Tomasi S., Carrington S., Martin B., Renault J., Blagbrough I. S., Uriac P. (2002): Effect of spermine conjugation on the cytotoxicity and cellular transport of acridine. *J. Med. Chem.*, **45**, 5098-5111.

- Dreyer M. K., Borcharding D. R., Dumont J. A., Peet N. P., Tsay J. T., Wright P. S., Bitonti A. J., Shen J., Kim S. H. (2001): Crystal structure of human cyclin-dependent kinase 2 in complex with the adenine-derived inhibitor H717. *J. Med. Chem.*, **44**, 524-530.
- Dreyer, M., Borcharding, D., Dumont, J., Peet, N., Tsay, J., Wright, P., Bitonti, A., Shen, J., and Kim, S. - H. (2001): Crystal Structure of Human Cyclin-Dependent Kinase 2 in Complex with the Adenine-Derived Inhibitor H717. *J. Med. Chem.*, **44**: 524-530.
- Dwyer M. P., Guzi T. J., Paruch K., Doll R. J., Keertikar K. M., Girijavallabhan V. M. inventors. (2004a): Pyrazolopyridines as cyclin-dependent kinase inhibitors. WO 2004/026872.
- Dwyer M. P., Guzi T. J., Paruch K., Doll R. J., Keertikar K. M., Girijavallabhan V. M. inventors (2004b): Novel imidazopyridines as cyclin-dependent kinase inhibitors. WO 2004/026867.
- Eiseman J. L., Rogers F. A., Guo Y., Kauffman J., Sentz D. L., Klinger M. F., Callery P. S., Kyprianou N. (1998): Tumor-targeted apoptosis by a novel spermine analogue, 1,12 diaziridinyl-4,9-diazadodecane, results in therapeutic efficacy and enhanced radiosensitivity of human prostate cancer. *Cancer Res.*, **58**, 4864-4870.
- Elnakat H., Ratnam M. (2004): Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1067-1084.
- Ernstoff, (2003) *Norris Cotton Cancer Center*  
<http://www.cancer.dartmouth.edu/clinicaltrials/trials/F0239.shtml>.
- Fischer P. M., Lane D. P. (2000): Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, **7**, 1213-1245.
- Fischmann T. O., Hruza A., Duca J. S., Ramanathan L., Mayhood T., Windsor W. T., Le H. V., Guzi T. J., Dwyer M. P., Paruch K., Doll R. J., Lees E., Parry D., Seghezzi W., Madison V. (2008): Structure-guided discovery of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biopolymers*, **89**, 372-379.
- Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A. T., Zalipsky S. (2004): Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1177-1192.
- Geney R., Chen J., Ojima I. (2005): Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. *Med. Chem.*, **1**, 125-139.
- Goren D., Horowitz A. T., Tzemach D., Tarshish M., Zalipsky S., Gabizon A. (2000): Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1949-57.
- Grammatikos S. I., Subbaiah P. V., Victor T. A., Miller W. M. (1994): n-3 and n-6 fatty acid processing and growth effects in neoplastic and non-cancerous human mammary epithelial cell lines. *Br. J. Cancer*, **70**, 219-227.
- Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T. C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., Schultz P. G. (1998): Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*, **281**, 533-538.
- Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Bazgier V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V. (2013): A Novel Series of Highly Potent 2,6,9-Trisubstituted Purine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **56**, 6234-6247.
- Hamann P. R., Hinman L. M., Beyer C. F., Lindh D., Upeslaciis J., Flowers D. A., Bernstein I. (2002a): An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 40-46.
- Hamann P. R., Hinman L. M., Hollander I., Beyer C. F., Lindh D., Holcomb R., Hallett W., Tsou H. R., Upeslaciis J., Shochat D., Mountain A., Flowers D. A., Bernstein I. (2002b): Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 47-58.
- Hardcastle I. R., Arris C. E., Bentley J., Boyle F. T., Chen Y., Curtin N. J., Endicott J. A., Gibson A. E., Golding B. T., Griffin R. J., Jewsbury P., Menyerol J., Mesguiche V., Newell D. R., Noble M. E., Pratt D. J., Wang L. Z., Whitfield H. J. (2004): N2 substituted O6-cyclohexylmethylguanine derivatives: potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *J. Med. Chem.*, **47**, 3710-3722.

- Hattori Y., Maitani Y. (2004): Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer. *J. Control Release*, **97**, 173-183.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem*, **40**, 408-412.
- Havlíček L., Fuksová K., Kryštof V., Orság M., Vojtěšek B., Strnad M. (2005): 8-Azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 5399-5407.
- Heathcote D. A., Patel H., Kroll S. H. B., Hazel P., Periyasamy M., Alikian M., Kanneganti S. K., Jogalekar A. S., Scheiper B., Barbazanges M., Blum A., Brackow J., Siwicka A., R. D. M. Pace, Fuchter M. J., Snyder J. P., Liotta D. C., Freemont P. S., Aboagye E. O., R. Ch. Coombes, Barrett A. G. M., Ali S. (2010): A Novel Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Is a Potent Inhibitor of Cyclin-Dependent Protein Kinases 1, 2, and 9, Which Demonstrates Antitumor Effects in Human Tumor Xenografts Following Oral Administration. *J. Med. Chem.*, **53**, 8508–8522.
- Hoessel R., Leclerc S., Endicott J. A., Nobel M. E. M., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberg E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L. (1999): Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin dependent kinases. *Nature Cell Biol.*, **1**, 60-67.
- Holley J. L., Mather A., Wheelhouse R. T., Cullis P. M., Hartley J. A., Bingham J. P., Cohen G. M. (1992b): Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate. *Cancer Res.*, **52**, 4190–4195.
- Holley J., Mather A., Cullis P., Symons M. R., Wardman P., Watt R. A., Cohen G. M. (1992a) Uptake and cytotoxicity of novel nitroimidazole-polyamine conjugates in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. Pharmacol*, **43**, 763–769.
- Hsieh W. S., Soo R., Peh B. K., Loh T., Dong, D., Soh D., Wong, L. S., Green S., Chiao J., Cui C. Y., Lai Y. F., Lee S. C., Mow B., Soong R., Salto-Tellez M., Goh B. C. (2009): Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer. *Clin. Cancer Res.*, **15**, 1435-1442.
- Chang Y. T., Gray N. S., Rosania G. R., Sutherland D. P., Kwon S., Norman T. C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P. G. (1999): Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.*, **6**, 361-375.
- Chen K., Liu A. (1981): Differences in polyamine metabolism of the undifferentiated and differentiated neuroblastoma cells. Metabolic labeling of an 18,000-M(r) protein by [<sup>14</sup>C]putrescine and the conversion of putrescine to GABA. *FEBS Lett*, **134**, 71–74.
- Cheng M., Olivier P., Diehl J., Fero M., Roussel M., Roberts J., Sherr C. J. (1999): The p21(Cip1) and p27(Kip1)CDK ‘inhibitors’ are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.*, **18**, 1571-1583.
- Chu Y., Polson A. (2013): Antibody–drug conjugates for the treatment of B-cell non-Hodgkin’s lymphoma and leukemia. *Future Oncology*, **9**, 355-368.
- Jain P., Flaherty P. T., Yi S., Chopra I., Bleasdel G., Lipay J., Ferandin Y., Meijer L., Madrua J. D. (2011): Design, synthesis, and testing of an 6-O-linked series of benzimidazole based inhibitors of CDK5/p25. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 359-373.
- Jorda R., Paruch K., Kryštof V. (2012): Cyclin-dependent kinase Inhibitors Inspired by Roscovitine: Purine Bioisosters. *Current Pharmaceutical Design*, **18**, 2974-2980.
- Kaneko T., Willner D., Monković I., Knipe J. O., Braslawsky G. R., Greenfield R. S., Vyas D. M. (1991): New hydrazone derivatives of adriamycin and their immunoconjugates—a correlation between acid stability and cytotoxicity. *Bioconjug. Chem.*, **2**, 133-141.
- Kataoka K., Harada A., Nagasaki Y. (2001): Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 113-131.
- Kigawa J., Minagawa Y., Kanamori Y., Itamochi H., Cheng X., Okada M., Oishi T., Terakawa N. (1998): Glutathione concentration may be a useful predictor of response to second-line chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Cancer*, **82**, 697-702.



- Kitagawa M., Okabe T., Ogino H., Matsumoto H., Suzuki-Tahakasi I., Kokubo T., Higashi H., Saitoh S., Taya Y., Yasuda H., *et al.* (1993): Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene*, **8**, 2425-2432.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 417-425.
- Kruczynski A., Pillon A., Créancier L., Vandenberghe I., Gomes B., Brel V., Fournier E., Annereau J. P., Currie E., Guminski Y., Bonnet D., Bailly C., Guilbaud N. (2013): F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia*, **27**, 2139-2148.
- Krystof V., Uldrijan S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr. Drug Targets*, **11**, 291-302.
- Kryštof V., Strnad M. (2001): Inhibitory cyklin-dependentních kinas. *Chemické listy*, **95**, 295-300.
- Kryštof V., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Fischer P. M., Müller P., Vojtěšek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005): Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9 trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1763-1771.
- Ladino C. A., Chari R. V., Bourret L. A., Kedersha N. L., Goldmacher V. S. (1997): Folate maytansinoids: target-selective drugs of low molecular weight. *Int J Cancer*, **73**, 859-864.
- Lam L.; Lam C.; Li W. H.; Cao Y.(2003), *Drug Future*, **28**, 905.
- Lapenna S., Giordano A. (2009): Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **8**, 547-566.
- Le T. C., Faivre S., Laurence V., Delbaldo C., Vera K., Girre V., Chiao J., Armour S., Frame S., Green S. R., Gianella-Borradori A., Dieras V., Raymond E. (2010): Phase I evaluation of seliciclib (Roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur. J. Cancer*, **46**, 3243-3250.
- Leamon C. P., Reddy J. A., Klein P. J., Vlahov I. R., Dorton R., Bloomfield A., Nelson M., Westrick E., Parker N., Bruna K., Vetzal M., Gehrke M., Nicoson J. S., Messmann R. A., LoRusso P. M., Sausville E. A. (2011): Reducing undesirable hepatic clearance of a tumor-targeted vinca alkaloid via novel saccharopeptidic modifications. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **336**, 336-343.
- Lee J. W., Lu J. Y., Low P. S., Fuchs P. L. (2002): Synthesis and evaluation of taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2397-2414.
- Losiewicz M. D., Carlson B. A., Kaur G. K., Sausville E. A., Worland P. J. (1994): Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 589-595.
- Love R., Jacoby R., Newton M., Tutsch K., Simon K., Pomplun M., Verma A. (1998): A randomized, placebo-controlled trial of lowdose alpha-difluoromethylornithine in individuals at risk for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.*, **7**, 989-992.
- Lu Y., Low P. S. (2002): Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 675-693.
- Luo Y., Bernshaw N. J., Lu Z. R., Kopecek J., Prestwich G. D. (2002): Targeted delivery of doxorubicin by HPMA copolymer-hyaluronan bioconjugates. *Pharm. Res.*, **19**, 396-402.
- Luo Y., Prestwich G. D. (1999): Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid antitumor bioconjugate. *Bioconjug. Chem.*, **10**, 755-763.
- MacCallum D. E., Melville J., Frame S., Watt K., Anderson S., Gianella-Borradori A., Lane D. P., Green S. R. (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down regulation of Mcl-1. *Cancer Res.*, **65**, 5399-5407.
- Malínková V. (2013): Příprava a biologická aktivita nových 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potenciální vyšší metabolickou stabilitou. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 630-641.
- Malumbres M., Barbacid M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 153-166.

- Malumbres M., Sotillo R., Santamaría D., Galán J., Cerezo A., Ortega S., Dubus P., Barbacid M. (2004): Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, **118**, 493-504.
- Manabe Y., Tsubota T., Haruta Y., Kataoka K., Okazaki M., Haisa S., Nakamura K., Kimura I. (1985): Production of a monoclonal antibody-mitomycin C conjugate, utilizing dextran T-40, and its biological activity. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 289-291.
- Massard C., Soria J. C., Anthony D. A., Proctor A., Scaburri A., Pacciarini M. A., Laffranchi B., Pellizzoni C., Kroemer G., Armand J. P., Balheda R., Twelves C. J. (2011): A first in man, phase I dose-escalation study of PHA-793887, an inhibitor of multiple cyclin dependent kinases (CDK2, 1 and 4) reveals unexpected hepatotoxicity in patients with solid tumors. *Cell Cycle*, **10**, 963-970.
- Meijer L. (1999): Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Cell Biology*, **6**, 393-397.
- Meijer L., Raymond E. (2003): Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc. Chem. Res.*, **36**, 417-425.
- Meijer, L., Bettayeb, K. and Galons, H., (2006): R-roscovitine (CYC202, Seliciclib). In "Monographs on enzyme inhibitors", Volume 2. CDK inhibitors and their potential as anti-tumor agents, (E. Yue and P. J. Smith, editors). CRC Press, Taylor & Francis, **9**, 187-226.
- Meyskens F. J., Gerner E., Emerson S., Pelot D., Durbin T., Doyle K., Lagerberg W. (1998): Effect of alpha-difluoromethylornithine on rectal mucosal levels of polyamines in a randomized, doubleblinded trial for colon cancer prevention. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 1212-1218.
- Moravcová D., Kryštof V., Havlíček L., Moravec J., Lenobel R., Strnad M. (2003): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.*, **13**, 2989-2992.
- Muth A., Kamel J., Kaur N., Shicora A. C., Ayene I. S., Gilmour S. K., Otto Phanstiel O. (2013): Development of Polyamine Transport Ligands with Improved Metabolic Stability and Selectivity against Specific Human Cancers. *J. Med. Chem.*, **56**, 5819-5828.
- Oh CH., Kim H. K., Lee S. C., Oh C., Yang B. S., Rhee H. J., Cho J. H. (2001): Synthesis and biological properties of C-2, C-8, N-9 substituted 6-(3-chloroanilino)purine derivatives as cyclin-dependent kinase inhibitors. Part II. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **334**, 345-350.
- Palmer A. J., Wallace H. M. (2010): The polyamine transport system as a target for anticancer drug development. *Amino Acids*, **38**, 415-422.
- Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N., Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R., Nomeir A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E. M. (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin dependent kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 2344-2353.
- Paruch K., Dwyer M. P., Alvarez C., Brown C., Chan T., Doll R. J., Keertikar K., Knutson Ch., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fischmann T. O., Hruza A., Madison V., Nomeir A. A., Wang Y., Lees E., Parry D., Sgambellone N., Seghezzi W., Schultz L., Shanahan F., Wiswell D., Xu X., Zhou Q., James R. A., Paradkar V. M., Park H., Rokosz L. R., Stauffer T. M., Guzi T. J. (2007): Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **17**, 6220-6223.
- Paruch K., Guzi T. J., Dwyer D. M., Doll R. J., Girijavallabhan V. M., Mallams A. K., inventors. Imidazopyrazines as cyclin dependent kinase inhibitors. WO 2004/026877. 2004 Apr 1.
- Phanstiel O, Kaur N, Delcros J. (2007): Structure-activity investigations of polyamine anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter. *Amino Acids*, **33**, 305-313.
- Popowycz F., Fournet G., Schneider C., Bettayeb K., Ferandin Y., Lamigeon C., Tirado O. M., Mateo-Lozano S., Notario V., Colas P., Bernard P., Meijer L., Joseph B. (2009): Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *J. Med. Chem.*, **52**, 655-663. Richardson C.

- M., Williamson D. S., Parratt M. J., Borgognoni J., Cansfield A. D., Dokurno P., Francis G. L., Howes R., Moore J. D., Murray J. B., Robertson A., Surgenor A. E., Torrance C. J. (2006). Triazolo[1,5-a]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: protein structure-guided design and SAR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1353-1357.
- Porter C. W., Miller J., Bergeron R. J. (1984): Aliphatic chain length specificity of the polyamine transport system in ascites L1210 leukemia cells. *Cancer Res*, **44**, 126-128
- Rialet V., Meijer L. (1991): A new screening test for antimetabolic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res.*, **11**, 1581-1590.
- Roy U. K., Rial N. S., Kachel K. L., Gerner E. W. (2008): Activated K-RAS increases polyamine uptake in human colon cancer cells through modulation of caveolar endocytosis. *Mol. Carcinog.*, **47**, 538-553.
- Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massague J., Pavletich N. P. (1996): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, **382**, 325-331.
- Říhová B. (1998): Receptor-mediated targeted drug or toxin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 273-289.
- Sauer L. A., Dauchy R. T. (1992): Sauer L. A., Nagel W. O., Dauchy R. T., Miceli L. A., Austin J. E. (1986): Stimulation of tumor growth in adult rats in vivo during an acute fast. *Cancer Res.*, **46**, 3469-3475.
- Seiler N., Delcros J. G., Moulinoux J. P. (1996): Polyamine transport in mammalian cells: an update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 843-861.
- Seiler N., Delcros J., Moulinoux J. (1996): Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 843-861.
- Seiler N., Dezeure F. (1990): Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biochem.*, **22**, 211-218.
- Sherr C. J. (2000): The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, **60**, 3689-3695.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1999): Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13**, 1501-1512.
- Shum P. W., Peet N. P., Weintraub P. M., Le T. B., Zhao Z., Barbone F., Cashman B., Tsay J., Dwyer S., Loos P. C., Powers E. A., Kropp K., Wright P. S., Bitonti A., Dumont J., Borchering D. R. (2001): The design and synthesis of purine inhibitors of CDK2. III. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 1067-1078.
- Sinha A. A., Jamuar M. P., Wilson M. J., Rozhin J., Sloane B. F. (2001): Plasma membrane association of cathepsin B in human prostate cancer: biochemical and immunogold electron microscopic analysis. *Prostate*, **49**, 172-184.
- Smalley K. S., Contractor R., Nguyen T. K., Xiao M., Edwards R., Muthusamy V., King A. J., Flaherty K. T., Bosenberg M., Herlyn M., Nathanson K. L. (2008): Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res.*, **68**, 5743-5752.
- Soulet D., Gagnon B., Rivest S., Audette M., Poulin R. (2004): A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J. Biol. Chem.*, **279**, 49355-49366.
- Sridhar J., Akula N., Pattabiraman N. (2006): Selectivity and Potency of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. *The AAPS Journal*, **8**, 204-221.
- Sroka I. M., Heiss E. H., Havlíček L., Totzke F., Aristei Y., Pechan P., Kubbutat M. H., Strnad M., Dirsch V. M. (2010): A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, **77**, 255-261.
- Takahashi M., Przetakiewicz M., Ong A., Borek C., Lowenstein J. M. (1992): Effect of omega 3 and omega 6 fatty acids on transformation of cultured cells by irradiation and transfection. *Cancer Res.*, **52**, 154-162.
- The effect of omega-6 and omega-3 fatty acids on 3H thymidine incorporation in hepatoma 7288CTC perfused in situ. *Br. J. Cancer*, **66**, 297-303.

- Tong W. G., Chen R., Plunkett W., Siegel D., Sinha R., Harvey R. D., Badros A. Z., Popplewell L., Coutre S., Fox J. A., Mahadocon K., Chen T., Kegley P., Hoch U., Wierda W. G. (2010): Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, **28**, 3015-3022.
- Toole B. P. (1981): Glycosaminoglycans in morphogenesis. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. (E. D. Hay. ed.), Plenum Press, New York, 259-294.
- Vaage J., Mayhew E., Lasic D., Martin F. (1992): Therapy of primary and metastatic mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in long circulating liposomes. *Int. J. Cancer*, **51**, 942-948.
- Wallace H. M., Fraser A. V. (2004): Inhibitors of polyamine metabolism. *Amino Acids*, **26**, 353-365.
- Weitman S. D., Lark R. H., Coney L. R., Fort D. W., Frasca V., Zurawski V. R. J., Kamen B. A. (1992): Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.*, **52**, 3396-3401.
- Whittaker S. R., Walton M. I., Garrett M. D., Workman P. (2004): The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.*, **64**, 262-272.
- Zaharevitz D. W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A. M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville E. A. (1999): Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.*, **59**, 2566-2569.

## 8. Seznam použitých zkratek

AIBN	2,2'-azobis(2-ethylpropionitril)
Boc <sub>2</sub> O	di-terc-butyl dikarbonát
DOX	doxorubicin
CDK	cyklin dependentní kináza/y
CIP/KIP	přirozené inhibitory CDK (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein)
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DFMO	difluoromethylornitin
DHA	dokosahexaenová kyselina
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DIPEA	diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsuloxid
FR	folátový receptor
HA	hyaluronová kyselina
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
INK4	přirozený inhibitor
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LNA	linolenová kyselina
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibodies)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
NMR	nukleární magnetická resonance
PEG	polyethylenglykol
PTS	polyaminový transportní systém
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
Put	putrescin
RBp	retinoblastoma protein
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou (structure and activity relationship)
RNA	ribonukleotidová kyselina
Spd	spermidin
Spm	spermin
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)