UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Syntéza a biologická aktivita nových inhibitorů kinas

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Veronika Malínková
B1406 Biochemie
Biochemie
Prezenční
doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
2017

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním disertační práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, podporu, konzultace, cenné rady, pomoc při psaní publikací a zpracování této disertační práce. Rovněž bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za podnětné rady v oblasti chemické syntézy a nemalý dík patří také Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D. a Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při experimentální práci. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů a Oddělení chemické biologie a genetiky za vstřícnost a pomoc.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Mgr. Veronika Malínková
Název práce	Syntéza a biologická aktivita nových inhibitorů kinas
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Konzultant	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Po objevu imatinibu se kinasy staly jednou nejintenzivněji studovanou skupinou cílů pro léčiva. Od té doby byly připraveny látky, které inhibují více než 30 druhů různých kinas, kdy převážná část z nich souvisí s rakovinou, ale i imunologickými, neurologickými, metabolickými a infekčními onemocněními. Mezi významné farmakofory patří purinové jádro a mnoho purinových derivátů se dokonce dostalo do preklinického nebo klinického testování. Tato disertační práce byla zaměřena nejprve na přípravu nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů a jejich charakterizaci. Látky byly navrženy tak, aby vykazovaly potenciální aktivitu vůči PDGFR α a FLT3. Tyto kinasy patří mezi tyrosinové kinasy často onkogenně aktivované u různých nádorových onemocnění. Bylo zjištěno, že důležitým strukturním motivem pro jejich inhibici je přítomnost 6-fenylaminopyrimidinového motivu. Součástí práce byla i charakterizace biologických účinků připravených látek na vybraných nádorových liniích, kde byla zjištěna antiproliferační aktivita a její souvislost s inhibicí kinas PDGFR α a FLT3.

Klíčová slova	kinasy, inhibitory kinas, 2,6,9-trisubstituované puriny, PDGFR α , FLT3
Počet stran	108
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Mgr. Veronika Malínková
Title	Synthesis and biological activity of novel kinases inhibitors
Type of thesis	Ph.D. thesis
Department	Laboratory of Growth Regulators Centre of the region Hana for biotechnological and agricultural research, Faculty of Science Palacky University & Institute of experimental botany ASCR
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Consultant	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Following the discovery of imatinib, kinases have become one of the most intensively studied target groups for pharmaceuticals. Since then, substances have been prepared that inhibit more than 30 kinds of various kinases, most of which are related to cancer but also immunological, neurological, metabolic and infectious diseases. Significant pharmacophores include the purine moiety and many purine derivatives have even undergone preclinical or clinical testing. This Ph.D. thesis was initially focused on the preparation of new 2,6,9-trisubstituted purines and their characterization. The compounds were designed to show potential activity against PDGFR α and FLT3. These kinases are among tyrosine kinases often oncogenically activated in various cancer diseases. It has been found that an important structural motif for their inhibition is the presence of the 6-phenylaminopyrimidine moiety. Part of the work was also the characterization of biological effects of prepared substances on selected tumor lines, where antiproliferative activity and its association with inhibition of PDGFR α and FLT3 kinases were detected.

Keywords	kinases, kinase inhibitors, 2,6,9-trisubstituted purines, PDGFR α , FLT3
Number of pages	108
Number of appendices	3
Language	Czech

OBSAH

1	CÍLE	PRÁCE	. 8
2	ÚVOI	D	. 9
3	KINA	SY	10
4	OBEC	CNÁ KLASIFIKACE INHIBITORŮ	11
4	.1 Ir	nhibitory na bázi purinu	13
5	INHI	BITORY TYROSINOVÝCH KINAS	15
5	5.1 Ir	nhibitory receptorových tyrosinových kinas	16
	5.1.1.	Inhibitory FLT3	18
	5.1.2.	Inhibitory MER a AXL	20
	5.1.3.	Inhibitory EGFR	23
5	5.2. Ir	nhibitory nereceptorových tyrosinových kinas	28
	5.2.1.	Inhibitory Src	28
	5.2.2.	Inhibitory Bcr-Abl/ Src-Abl	32
	5.2.3.	Inhibitory Bruton kinasy	35
	5.2.4.	Inhibitory Janusovy kinasy	37
6.	INHI	BITORY SERIN/THREONINOVÝCH KINAS	40
	6.1.	Inhibitory PAK	40
	6.2.	Inhibitory CK1	42
	6.3.	Inhibitory BRAF	45
	6.4.	Inhibitory CDK	47
	6.5.	Inhibitory PDK1	50
	6.6.	Inhibitory NEK2	52
	6.7.	Inhibitory Aurora kinasy	55
	6.8.	Inhibitory GSK-3	56
7.	INHI	BITORY OSTATNÍCH KINAS	59
	7.1.	Inhibitory PI3K	59
8.	METO	DDY	64
8	.1. S	yntetické metody	64
	8.1.1.	Příprava aminů pro sérii FLT3 inhibitorů	64
	8.1.2.	Příprava N9-substituovaných derivátů purinu	64

8	.1.3.	Substituce na C6	65
8	.1.4.	Substituce na C2	65
8.2.	. An	alytické metody	66
8.3.	Bio	ochemické metody	67
8	.3.1.	Buněčné linie	67
8	.3.2.	Stanovení cytotoxicity	68
8	.3.3.	Test inhibice proteinkinas	69
8	.3.4.	Analýza buněčného cyklu	69
8	.3.5.	Imunodetekce	
9. K	COME	NTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE	71
9.1.	Sy	ntéza nových inhibitorů PDGFRα a FLT3	
9.2.	. Vz	tahy mezi strukturou připravených látek a inhibicí PDGFR α	
9.3.	. Vz	tahy mezi strukturou připravených látek a inhibicí FLT3	
9.4.	Bu	něčné účinky připravených inhibitorů	
10.	ZÁV	ĚR	
11.	SEZI	NAM CITOVANÉ LITERATURY	
12.	SEZI	NAM POUŽITÝCH ZKRATEK	
13.	CUR	RICULUM VITAE	
14.	SEZI	NAM PŘÍLOH	108

1. CÍLE PRÁCE

Cíle předložené disertační práce byly stanoveny takto:

- syntéza nových inhibitorů proteinkinas na bázi 2,6,9-trisubstituovaných purinů,
- chemická charakterizace (struktura, identita, čistota) nově připravených látek,
- studium vztahu mezi strukturou a aktivitou těchto látek,
- studium mechanismu protinádorové aktivity připravených inhibitorů v modelových systémech *in vitro*.

2. ÚVOD

Díky deregulaci a mutacím proteinových kinas v mnoha lidských onemocněních se tato rodina enzymů stala za posledních dvacet let jedním z nejdůležitějších cílů léčiv. Za tuto dobu byly vyvinuty inhibitory více než 30 různých kinas, z nichž převážná část souvisí s rakovinou, imunologickými, neurologickými, metabolickými a infekčními onemocněními (Zhang *et al*, 2009).

Proteinové kinasy zprostředkovávají fosforylaci aminokyselinových zbytků v proteinech (serin, threonin, tyrosin) a modulují tím nejen přenos signálů, ale i mnoho dalších procesů včetně metabolismu, transkripce, progrese buněčného cyklu, přeskupení cytoskeletu a pohybu buněk, apoptosy a diferenciace. Popularita kinas je dána několika faktory. Za prvé, lidský set proteinových kinas (kinom) se skládá z 518 proteinů dělících se do osmi rodin (AGC, CAMK, CKI, CMGC, STE, TK, TKL, RGC) a tvoří největší rodinu genů u eukaryot (Manning, 2002). Prakticky každá dráha přenášející signál v buňce je součástí složitější kaskády a jejich inhibice může vyvolat reálnou fyziologickou nebo léčebnou odpověď. Za druhé, i přes vysoký stupeň konzervativnosti ATP-vazebného místa prakticky všech proteinkinas, mohou být připraveny vysoce selektivní malé molekuly s výhodnými farmaceutickými vlastnostmi. Za třetí, inhibice aktivity kinas v normálních buňkách může být překvapivě tolerována, což představuje terapeutické okno pro selektivní ovlivnění nádorových buněk. Nicméně navzdory těmto skutečnostem se vývoj léčiv na této bázi setkává s problémy jako je nízká selektivita, nízká účinnost, absence zjevného konkrétního buněčného cíle u dané nemoci, případně také vznik specifické rezistence (Zhang *et al*, 2009).

3. KINASY

Rakovina je charakterizována nekontrolovanou proliferací nádorových buněk, která je výsledkem aberantní aktivity různých genů. Mnoho typů rakoviny vykazuje jednoznačnou závislost na kinasach, a proto jsou selektivně citlivé na jejich inhibici (Asghar *et al*, 2015). Díky tomu je inhibice kinas dnes jedním z nejčastějších využívaných přístupů v designu moderní cílené léčby rakoviny. Na základě farmakologických, patologických a genetických důkazů jsou kinasy považovány za vhodné cíle u řady onemocnění, jako je zmíněná rakovina, zánětlivá onemocnění (Barnes, 2013; Clark *et al*, 2014), onemocnění centrálního nervového systému (Muth *et al*, 2015), kardiovaskulární onemocnění (Kikuchi *et al*, 2014) a diabetu (Banks *et al*, 2015; Wu *et al*, 2015).

Lidské kinasy sdílejí velký stupeň podobnosti v terciární struktuře, zejména v jejich katalyticky aktivní kinasové doméně (Obr. 1), kde je umístěno ATP-vazebné místo skládající se z β -listu obsahujícího N-terminální smyčku a α -helixové C-terminální smyčky a spojovacího regionu. Flexibilní aktivační smyčka s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí Asp-Phe-Gly (DFG) řídí přístup k aktivnímu místu a její konformace se mění v závislosti na aktivačním stavu kinasy. Adenosin trifosfát (ATP) se váže mezi N- a C-smyčku a většina kinasových inhibitorů kompetuje s ATP právě o interakce v této oblasti (Hubbard and Till, 2000).



Obr. 1: ATP-vazebné místo AKT1s navázaným ATP (PDB: 106L). Vodíkové vazby jsou vyznačeny červenými přerušovanými čárami (podle Zhang *et al*, 2009).

4. OBECNÁ KLASIFIKACE INHIBITORŮ

Naprostá většina dostupných inhibitorů proteinových kinas kompetují v aktivním místě s ATP. Kromě toho byly připraveny také inhibitory ireverzibilní, které bývají obvykle kovalentně vázány na nukleofilní cysteinové reziduum v blízkosti ATP-vazebného místa, což vede k zablokování ATP místa a ireverzibilní inhibici (Wu *et al*, 2015).

Reverzibilní inhibitory mohou být klasifikovány do čtyř hlavních tříd na základě konformace vazebného místa a DFG motivu (Obr. 2). Inhibitory typu I jsou ATP-kompetitivní inhibitory, které se vážou na aktivní konformaci kinasy a vytváří vazbu s aspartátovým zbytkem DFG motivu směřujícího do aktivního místa kinasy. Inhibitory typu II se váží a stabilizují inaktivní konformaci kinasy vazbou na aspartátová residua DFG motivu, který vyčnívá směrem ven z ATP vazebného místa. Inhibitory typu III se výhradně váží do alosterické kapsy sousedící s ATP vazebným místem bez jakékoliv interakce s vazebným místem pro ATP, zatímco inhibitory typu IV se váží do alosterického místa, které je vzdálené od ATP-vazebného místa (Wu *et al*, 2015).



Obr. 2: Typy reverzibilních inhibitorů (podle Wu, Nielsen and Clausen, 2015).

Nové ATP kompetitory jsou nejčastěji vyvíjeny kombinací tří racionálních metod (Zhang *et al*, 2009): chemickými obměnami známých inhibitorů (analog synthesis), designem založeným na znalosti struktury vazebného místa proteinu (structure-informed design) a spojováním fragmentů interagujících ve vazebném místě (fragment-based assembly). Při vývoji nových inhibitorů kinas se mnohdy používá screeningu inhibitorů, které byly identifikovány v předchozích projektech jako méně specifické. Často se využívá isosterického nahrazování určité části molekuly, která se může podílet na klíčové vazbě

v aktivním místě a specifitu nemění, nebo ji naopak výrazně upravuje. Takto byly vytvořeny inhibitory, které jsou schopny rozpoznat ATP-vazebné místo, jako například chinazoliny, pyrimidiny, puriny, imidazoly, pyrazoly, oxindoly a chinoliny (Zhang *et al*, 2009). Po identifikaci takovéhoto skeletu je v ideálním případě studována struktura komplexu inhibitor-kinasa, což poskytuje informace o způsobu vazby, které jsou důležité pro pochopení účinnosti a selektivity inhibitoru. Na základě zjištěné struktury jsou poté připraveny další analoga tak, aby modulovaly účinnost, selektivitu a farmakologické vlastnosti. Isosterická nahrazení se používají pro zlepšení těchto vlastností při zachování stereo-elektronových spojení zodpovědných za vazbu do kinasy (Zhang *et al*, 2009). Znalost klíčových interakcí mezi inhibitorem a aktivním místem umožňuje navrhovat sloučeniny *de novo*, nebo kombinovat části známých inhibitorů a vytvářet tak nové hybridní molekuly (Okram *et al*, 2006; Liu and Gray, 2006). To může být především efektivní způsob pro tvorbu nových inhibitorů typu II.

Design inhibitorů na základě fragmentů interagujících v různých částech aktivního místa proteinu je obvykle založen na chemické knihovně, z níž jsou výpočetně (virtuálně) nebo experimentálně (NMR, krystalografie, mikrokalorimetrie atp.) vybírány sloučeniny i s nízkou afinitou k proteinu. Typické fragmenty mají obvykle nízkou molekulovou hmotnost (<150 Da), dobrou rozpustnost ve vodě (logP < 3), počet potenciálních akceptorů a donorů vodíkových vazeb menší než 3 a počet rotujících vazeb menší než 3. Následuje design inhibitoru kombinující nalezené fragmenty a jejich syntéza, přičemž výsledné molekuly obvykle mají na rozdíl od fragmentů vysokou afinitu k proteinu (Zhang *et al*, 2009).

4.1 Inhibitory na bázi purinu

ATP, cAMP, NAD, FAD, koenzym A a další patří mezi purinové sloučeniny zapojené v mnoha základních buněčných procesech. Díky snadné chemické modifikaci purinu se v průběhu let purinové jádro stalo významným farmakoforem a jedním z nejhojněji používaným heterocyklem ve vývoji inhibitorů různých proteinů, včetně proteinkinas. Zavedením substituentů do polohy 2, 6, 8 a 9 se často výrazně mění způsob vazby, afinita a selektivita vůči různým proteinovým cílům (Sharma *et al*, 2016). Mnoho purinových derivátů se dostalo do preklinického nebo klinického testování (Obr. 3) a některé látky obsahující purinový skelet se již využívají jako léčiva, např. pro léčbu akutní leukémie (thiopuriny, pentostatin), jako antivirotika (acyklovir, penciklovir, ganciklovir), imunosupresiva (azathioprin), protinádorové látky (vidarabin) a broncholidátory (eofylin) (Sharma *et al*, 2016).



Obr. 3: Významné purinové inhibitory kinas. Látky nacházející se v klinickém testování jsou označeny "*".

Pokroky v návrhu a vývoji léků na bázi purinového skeletu inspirovaly rovněž paralelní vývoj strukturně příbuzných heterocyklických systémů, tzv. purinových isosterů (Obr. 4), tedy strukturně podobných látek s různým počtem a uspořádáním dusíků (případně jiných heteroatomů) v jejich základním skeletu. Zvyšující se molekulární rozmanitost používající různé purinové isostery je ideální pro objev nových terapeutických činidel, které selektivně inhibují purin dependentní enzymy a receptory (Lim and Dolzhenko, 2014). Isostery se totiž mohou lišit ve fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je metabolická stabilita, biodostupnost a farmakokinetické vlastnosti (Popowycz *et al*, 2009). Dalším faktorem, který výrazně přispívá k obměnám heteroatomů v centrálních heterocyklech, isosternímu nahrazování farmakoforů a syntéze analogů, je možnost ochrany duševního vlastnictví nových derivátů za účelem zhodnocení jejich komerční hodnoty.



Obr. 4: Příklady purinových isosterů, které byly využity pro vývoj inhibitorů kinas.

V následujících kapitolách budou popsány purinové inhibitory, případně látky s isosterním heterocyklem, které inhibují různé kinasy a jsou vyvinuty pro terapeutické účely (pozn. uvedené struktury jsou očíslovány dle původní literatury). Nicméně použití purinových inhibitorů se nevztahuje pouze na kinasy, ale i jiné proteinové cíle. Purinové deriváty našly uplatnění také jako inhibitory Hsp90 (Llauger *et al*, 2005; Chiosis *et al*, 2001), sulfotransferas (Chapman *et al*, 2002), fosfodiesteras (Pissarnitski *et al*, 2004; Pitts *et al*, 2004), AAK1 (Shahani *et al*, 2013), purinové nukleosidfosforylasy (Halazy *et al*, 1991), BRD9 (Picaud *et al*, 2015), 5'-nukleotidasy II (Cividini *et al*, 2015), leukotrien A4 hydrolasy (Penning *et al*, 2003), cysteinové proteasy kathepsinu K (Robichaud *et al*, 2003) (Altmann *et al*, 2004), polymerizace mikrotubulů (myoseverin – (Chang *et al*, 2001), cholinesterasy (Schwarz *et al*, 2014) a troponin I-interagující kinasy (TNNI3K) (Lawhorn *et al*, 2015). Dále se deriváty purinu dají použít jako induktory interferonu (Hirota *et al*, 2002; Kurimoto *et al*, 2004), ligandy adenosinových receptorů (Poulsen and Quinn, 1998; Perreira *et al*, 2005), modulátory CRH-R1 (Beck *et al*, 1999) a mimetika proteinu A (Zacharie *et al*, 2009).

5. INHIBITORY TYROSINOVÝCH KINAS

Proteinové tyrosinové kinasy (TK) jsou enzymy přenášející γ-fosfátovou skupinu z ATP na hydroxylovou skupinu tyrosinových reziduí substrátových proteinů (Schlessinger, 2000). Tyrosinové kinasy hrají ústřední roli zejména v přenosu buněčných signálů a přísná regulace jejich aktivit kontroluje nejdůležitější procesy v buňce (růst, diferenciace, adheze, motilita, smrt). Genetické změny tyrosinových kinas jsou spojovány s rozvojem mnoha onemocnění včetně diabetu a rakoviny, ale i s řadou vrozených syndromů (Robinson *et al*, 2000). Důsledkem genetických změn je ztráta kontroly jejich aktivity. Ta způsobuje nadměrnou fosforylaci jejich substrátů udržováním signální transdukční dráhy v aktivovaném stavu.

Lidský genom obsahuje 90 tyrosinkinasových genů, které se dělí do dvou skupin na základě přítomnosti transmembránových a extracelulárních domén. První skupinou jsou geny kódující receptorové kinasy (celkem 58), které můžeme rozdělit do 20 podrodin na základě sekvence jejich kinasové domény. Receptorové TK (RTK) přenášejí signály přes buněčnou membránu, a to oběma směry. Druhou skupinou jsou geny, které kódují nereceptorové TK (NRTK), kam spadá 32 genů. Ty můžeme ještě rozdělit do 10 podrodin (Robinson *et al*, 2000). Nereceptorové TK se nacházejí uvnitř buňky a postrádají transmembránovou část. Mnoho typů receptorových i nereceptorových TK jsou u lidských malignit mutované nebo nadměrně exprimované. Úloha TK u rakoviny je velmi významná a jsou proto využívány jako cíl léčby. Na trhu je dostupných několik protinádorových léků, kdy mezi často klinicky cílené receptorové TK patří EGFR, PDGFR a VEGR (Vlahovic, 2003).

První diskuse o nízkomolekulárním a specifickém inhibitoru TK proběhly již v 90. letech 20. století. Inhibice aktivity TK pomocí nízkomolekulárních sloučenin schopných interferovat buď s vázajícím se ligandem (v případě RTK) nebo s proteinovým substrátem (NRTK) byla považována za nereálnou (Bennasroune *et al*, 2004). Pokusy o identifikaci nekompetitivních nebo alosterických inhibitorů také selhaly, tudíž inhibice pomocí ATP-kompetitivních inhibitorů se zdá být nejlepší volbou (Paul and Mukhopadhyay, 2004). Prvním schváleným léčivem na bázi inhibitorů TK je imatinib (Gleevec), který inhibuje fúzní proteinkinasu BCR-ABL podílející se na fenotypu chronické myeloidní leukémie (Deininger *et al*, 1997; Cohen *et al*, 2002).

5.1 Inhibitory receptorových tyrosinových kinas

Receptorové tyrosinové kinasy (RTK) jsou transmembránové proteiny v plazmatické membráně, které přenáší signály z extracelulárního prostředí do cytoplasmy nebo obráceně. Obecně jsou RTK aktivované vazbou ligandu do vazebného místa extracelulární domény, což obvykle vyvolává dimerizaci receptoru (Schlessinger, 2000) a autofosforylaci tyrosinových reziduí v intracelulární kinasové aktivační doméně nebo v juxtamembránové oblasti, což má za následek konformační změny, které vedou ke stabilizaci kinasy v aktivním stavu (Obr. 5; Hubbard, 2004). Fosfotyrosinové zbytky slouží jako signál a jsou rozpoznávány podřízenými signálními proteiny, které se na ně váží a touto vazbou jsou aktivovány. RTK regulují buněčné procesy jako je růst, diferenciace nebo motilita (Pawson *et al*, 2001; Hubbard and Miller, 2007).



Obr. 5: Aktivace receptorové tyrosinové kinasy (Alberts, 2008).

Mnoho onemocnění je výsledkem genetických změn nebo abnormalit, které mění aktivitu, abundanci, buněčnou distribuci nebo regulovatelnost RTK. Spojení RTK s nemocemi jako je rakovina, cukrovka, arterioskleróza vedlo k vývoji nové generaci látek, které blokují nebo zeslabují aktivitu RTK (Lemmon and Schlessinger, 2010). Několik léků bylo schváleno pro léčbu rakovin a jiných onemocnění způsobené aktivovanými RTK. Tyto látky můžeme rozdělit do dvou kategorií: na nízkomolekulární inhibitory, které obsazují vazebné místo pro ATP (např. **imatinib, gefitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, dasatinib, sunitinib**; Shawver *et al*, 2002), a na monoklonální protilátky, které interferují s aktivací RTK extracelulárním ligandem (např. **trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, panitumumab**; Reichert and Valge-Archer, 2007). Mnoho inhibitorů RTK může navíc oproti původnímu cíli inhibovat i jiné tyrosinkinasy (Obr. 6), což se stává hlavním problémem při léčbě. Tyto vedlejší cíle mohou být příčinou vedlejších účinků léčby. Z biochemického hlediska se jedná o nízkou selektivitu inhibitorů (Lemmon and Schlessinger, 2010).



Obr. 6: Selektivita vybraných klinicky používaných inhibitorů RTK (podle Ghoreschi et al, 2009).

5.1.1. Inhibitory FLT3

FLT3 (Fms- like tyrosine kinase 3) patří do skupiny RTK, charakterizované extracelulární vazbu ligandu, transmembránovým helixem C-terminální doménou pro a intracytoplasmatickou částí (Blume-Jensen and Hunter, 2001). FLT3 je exprimována výlučně v hematopoetických buňkách. Po vazbě ligandu FLT indukuje aktivaci intracelulárních signalizačních cest PI3K/AKT nebo ERK/MAPK (Levis, 2011). Mutace v genu pro FLT3, jako jsou interní tandemové duplikace (FLT3-ITD; v 30 % případů AML; Nakao et al, 1996) a aminokyselinové substituce (FLT3-TKD; v 5-10 % případů AML; Yamamoto et al, 2001), deregulují signální dráhy FLT3 a vyskytují se v mnoha případech akutní myeloidní leukémie (AML; Patel et al, 2012; Papaemmanuil et al, 2016). Mutace FLT3-ITD produkuje receptory s konstitutivní aktivitou v důsledku homodimerizace nebo heterodimerizace s normálními FLT3 receptory (Kiyoi et al, 1998). Zatímco FLT3 receptory indukují signální transdukci z buněčné membrány, FLT3-ITD receptory se většinou nacházejí v endoplazmatickém retikulu jako důsledek aberantní glykosylace, což vede ke ztrátě regulovatelnosti a hyperfosforylaci a aktivaci transkripčních faktorů STAT (Schmidt-Arras et al, 2009; Hospital et al, 2017).

Objev častých mutací FLT3 u pacientů s AML a zároveň nepříznivé klinické výsledky pacientů s mutací FLT3-ITD, vyvolaly snahu najít účinné inhibitory FLT3. FLT3 inhibitory můžeme dělit na inhibitory první a druhé generace na základě jejich specifičnosti pro FLT3 a na typ I a typ II na základě mechanismu interakce s kinasou. Inhibitory první generace (**sunitinib**, **sorafenib**; Obr. 7) mají nízkou specifičnost vůči FLT3, která je spojována nejen s omezenou aktivitou, ale také s nežádoucí toxicitou. Naproti tomu inhibitory druhé generace byly připraveny racionálním vývojem a jsou mnohdy specifičtější a účinnější. Mají také méně toxických účinků spojených s vedlejšími cíli. Inhibitory této generace, jako je například **quizartinib a crenolanib** (Obr. 7), jsou v klinickém testování (Larrosa-Garcia and Baer, 2017).

FLT3 inhibitory mohou být také klasifikovány na základě strukturní povahy jejich interakce s receptorem (Ke *et al*, 2015). Po aktivaci FLT3 ligandem dochází ke konformačním změnám vedoucím k aktivaci, které zahrnují přesunutí tří aminokyselinových zbytků (Asp-Phe-Gly neboli DFG motiv). Inhibitory typu I se vážou na aktivní receptor, zatímco typu II na receptor v neaktivní konformaci a brání tak aktivaci

receptoru. Aminokyselina D835 je nejběžněji mutovaným místem, které navíc ovlivňuje schopnost zaujmout aktivní konformaci. V důsledku toho inhibitory typu I inhibují signalizaci FLT3 u AML buněk jak u ITD, tak i u TKD mutace, zatímco inhibitory typu II inhibují FLT3 s ITD ale ne s mutacemi TKD (Smith *et al*, 2015). Mezi inhibitory typu I patří **sunitinib** a mezi inhibitory typu II například **sorafenib**, **quizartinib** a **ponatinib** (Obr. 7).

Vzhledem k problémům se selektivitou dostupných inhibitorů, jejich klinickou účinností a vznikem specifické rezistence, jsou i nadále hledány a vyvíjeny další inhibitory FLT3 pro léčbu AML. Jedním z nalezených inhibitorů je 2,6,9-trisubstituovaný purinový derivát **AP23846** (Obr. 7), který byl původně identifikován jako inhibitor kinasy Src vykazující antiangiogenní vlastnosti. Mezi jeho významné vedlejší cíle však patří také FLT3, která je inhibována s IC₅₀ = 1 nM (Summy *et al*, 2005). Další příbuzné purinové deriváty (např. látka **39**; Obr. 7) jsou ještě účinnější a dosahují hodnot IC₅₀ v rozmezí od 0,1 nM do 0,5 nM při inhibici FLT3 (Cheng *et al*, 2005). Mezi klinicky vyvíjené inhibitory FLT3 však purinové deriváty nepatří.



Obr. 7: Vybrané inhibitory FLT3.

5.1.2. Inhibitory MER a AXL

Mer spolu s Tyro-3 a Axl patří do rodiny TAM transmembránových receptorových TK. Členy TAM rodiny obsahují extracelulární doménu, transmembránovou doménu a konzervativní intracelulární kinasovou doménu, která je v porovnání s ostatními TK odlišná. Rozdíl je dán přítomností konzervované sekvence KW(I/L)A(I/L)ES v kinasové doméně a adhezním doménám v extracelulární oblasti složené ze dvou imunoglobulinových (Ig) a dvou fibronektinových domén typu III (FNIII). Tyto motivy jsou důležité při buněčném kontaktu a napodobují strukturu adhezní molekuly nervových buněk, která obsahuje pět Ig domén a dvě domény FNIII (Linger et al, 2008). Biologickými ligandy pro Mer jsou Gas6 (growth arrest specific 6) a protein S, které po vazbě způsobují dimerizaci a trans-autofosforylaci tyrosinových reziduí a aktivaci signální dráhy (Verma et al, 2011). Abnormální exprese a aktivace MER je asociována s adenomy hypofýzy (Evans et al, 2001), lymfomy plášťových buněk (Ek et al, 2002), akutní lymfoblastickou leukémií (Graham et al, 2006), akutní myeloidní leukémií (Lee-Sherick et al, 2013), nemalobuněčným karcinomem plic (Linger et al, 2013), melanomy (Schlegel et al, 2013) a glioblastomy (Wang et al, 2013b). Tyto skutečnosti činí z MER výhodný cíl pro selektivní inhibitory (Liu et al, 2012).

Preference Mer kinasy pro purinové inhibitory byla objevena v roce 2009, kdy bylo otestováno 157 kinasových inhibitorů, zdali interagují s Mer kinasou. Z této série inhibitorů se dva ukázaly býti inhibitory Mer s mikromolární aktivitou. Jedním z nich je substituovaný purinový derivát **látka 52** (Obr.8), slabý MER inhibitor (IC₅₀ = 11,3 μ M; Gray *et al*, 1998). Látka 52 byla krystalizována s MER a na základě molekulárního modelování byly navrženy analogické látky s potenciální vyšší inhibiční aktivitou proti Mer. Byla připravena série účinných trisubstituovaných pyrazolopyrimidinových inhibitorů Mer, kde látky **UNC2250** (IC₅₀ = 0,7 nM; Obr. 8; Zhang *et al*, 2013) a **UNC2025** (Mer: IC₅₀ = 0,5 nM, FLT3: IC₅₀ = 0,8 nM; Obr. 8; Zhang *et al*, 2014) jsou v preklinickém testování (Schoumacher and Burbridge, 2017). Látka UNC2025 se stala výchozím bodem pro přípravu série účinných makrocyklických pyrrolopyrimidinových Mer inhibitorů, kde nejúčinnější látka **UNC3133** (Obr. 8) vykazuje hodnotu IC₅₀ 3 nM (Wang *et al*, 2016b). Vývoj látek UNC je zaznamenám v Obr. 8.





Dalším členem TAM rodiny je Axl kinasa, která je nadměrně exprimována u několika hematologických a solidních malignit včetně akutní myeloidní leukémie (Ben-Batalla *et al*, 2013), nemalobuněčné rakoviny plic (Ishikawa *et al*, 2013), karcinomu prsu (Wang *et al*, 2013a) a vaječníků (Lozneanu *et al*, 2016). Nadměrná exprese Axl řídí rozsáhlé procesy, včetně přechodu epiteliálně-mezenchymálního, nádorovou angiogenezi,

rezistenci vůči chemoterapeutikům a léčivům a snižuje protinádorovou imunitní odpověď (Gay *et al*, 2017). Díky klíčové roli Axl v biologii nádorů a v terapeutické rezistenci je Axl atraktivním cílem pro antineoplastickou terapii. Její inhibice Axl vede ke zvyšování apoptosy v glioblastomu (Onken *et al*, 2016), zvyšuje citlivost nádorů k inhibitorům PARP (Balaji *et al*, 2016) a působí synergicky s antracyklinem v modelech rakoviny prsu (Wang *et al*, 2016a).

I přesto, že byla popsána celá řada inhibitorů Axl, ve většině případů Axl nebyl zamýšlen jako primární cíl, ale jeho inhibice je způsobena podobností mezi kinasovými doménami Axl a jiných RTK jako je Mer nebo Met. Mezi takové inhibitory patří **cabozantinib** (Abdelaziz and Vaishampayan, 2017) a **bosutinib** (Abbas and Hsyu, 2016), které jsou schválené FDA pro léčbu rakoviny štítné žlázy a CML a Axl je jejich vedlejším cílem. Nicméně byl ale popsán i opačný případ, kdy inhibitor Met **BMS-777607** (Obr. 9a) vykazuje třikrát vyšší účinnost proti Axl (Schroeder *et al*, 2009).

Slibným preklinickým kandidátem je purinový isoster **UNC2025**, který byl zmíněn výše již mezi inhibitory Mer (Obr. 8). Jedná se o duální inhibitor Mer/FLT3, který blokuje rovněž aktivitu Axl s IC₅₀ = 1,6 nM (Zhang *et al*, 2014). Tato látka vychází z inhibitoru Mer/FLT3 **UNC1062** (Obr. 8; Liu *et al*, 2013a), který tlumí aktivaci signální dráhy Mer v melanomu, indukuje apoptosu a inhibuje invazivitu (Schlegel *et al*, 2013; Myers *et al*, 2016). Dalším účinným inhibitorem Axl je **SGI-7079** (IC₅₀ = 5,7 nM, Obr. 9b), který však inhibuje i Mer, Met, RET, YES a FLT3. Ošetření buněk rakoviny plic touto látkou však způsobuje jejich senzibilizaci pro léčbu erlotinibem (Byers *et al*, 2013).



Obr. 9: Struktura: a) BMS-777607, b) SGI-7079.

5.1.3. Inhibitory EGFR

Lidské EGFR (také známé jako Her1/ErbB1) a jemu tři příbuzné receptory pro lidský epidermální růstový faktor 2, 3 a 4 (EGFR2, 3 a 4), kontrolují buněčný růst a diferenciaci. Tyto receptory vyvolávají silnou mitogenní odpověď. Genetické abnormality těchto receptorů představují jeden z nejčastějších defektů v rakovinných buňkách. EGFR byl první RTK, který byl rozpoznán jako onkogen. Více než 30 % případů rakoviny prsu (Harari and Yarden, 2000), 60 % nemalobuněčných karcinomů plic (Sharma *et al*, 2007) a 40 % glioblastomů (Westphal *et al*, 1997) nadměrně exprimují nebo obsahují aktivační mutace členů EGFR (Kovacs *et al*, 2015). Inhibitory těchto receptorů patří mezi neúspěšnější příklady cílených protinádorových terapií (Arteaga, 2003; Moasser, 2007) a zahrnují terapeutické protilátky (např. trastuzumab a cetuximab) a nízkomolekulární inhibitory tyrosinových kinas (např. erlotinib, gefitinib, lapatinib; Lemmon *et al*, 2014).

U lidí je EGFR regulován nejméně sedmi různými aktivačními ligandy: EGF, transformujícím růstovým faktorem α (TGF- α), betacelulinem (BTC), heparin vazebný růstový faktorem podobným EGF (HB-EGF), amphiregulinem (ARG), epiregulinem (EPR) a epigenem (EGN; Harris *et al*, 2003). Každý z ligandů obsahuje EGF doménu, která je zodpovědná za vazbu a aktivaci receptoru s charakteristickým vzorem šesti prostorově konzervovaných cysteinů, které vytvářejí tři intramolekulární disulfidy. Struktura extracelulární oblasti EGFR poskytla zajímavé informace o dimerizaci receptoru. Ukázalo se, že na rozdíl od jiných RTK je dimerizace extracelulární oblasti EGFR zprostředkována prostřednictvím kontaktů receptor-receptor. Ve všech případech, kromě inzulinového receptoru EGFR, se aktivující růstový faktor váže na dimerové rozhraní a efektivně zesíťuje oba receptory na dimer typicky s pomocí dalších receptor-receptor kontaktů (Lemmon and Schlessinger, 2010). Každý navázaný ligand je bivalentní. To znamená, že je současně v kontaktu s doménami I a III v extracelulární oblasti jednoho receptoru. Aktivace zahrnuje konformační změnu, která má za následek vytažení dimerizačního ramena domény II (Lemmon *et al*, 2014).

První generace reverzibilních inhibitorů EGFR (Obr. 10a), **erlotinib** a **gefitinib**, byly ve velké míře studovány v souvislosti s léčbou pacientů s pokročilými nemalobuněčnými karcinomy (Gridelli *et al*, 2015). Nádory nesoucí aktivující EGFR mutace, zejména deleci v exonu 19 a bodovou mutaci L858R, často dobře reagují na léčbu

23

inhibitory první generace. Dlouhodobé používání těchto inhibitorů nicméně často omezuje získaná rezistence (většinou bodová mutace T790M), která se objevuje u většiny pacientů během prvního roku léčby (Peters *et al*, 2014). Získaná rezistence u inhibitorů první generace proto vedla k vývoji inhibitorů druhé generace (**afatinib**, **dacomitinib**; Obr. 10b), které se ireverzibilně vážou na tyrosinkinasovou doménu EGFR a některé další receptory ErbB rodiny (např. Her2) a vykazují aktivitu také proti T790M-pozitivním nádorům (Tan *et al*, 2015; Liao *et al*, 2015).



Obr. 10: Vybrané inhibitory EGFR a) první generace, b) druhé generace, c) třetí generace.

Třetí generace (Obr. 10c) vychází z klinických přínosů dřívějších inhibitorů, které inhibují jak onkogenní varianty EGFR, tak i rezistentní mutanty s T790M, ale přitom výrazně slaběji interagují s přirozenou formou EGFR (Liao *et al*, 2015). Mezi třetí generaci (Obr. 10c) patří látky jako **osimertinib** a **rociletinib**, ale i purinové isostery jako je **olmutinib** (Kim, 2016), **avitinib** (Xu *et al*, 2016) a **nazartinib** (Lelais *et al*, 2016). **Nazartinib** (Obr. 11a) je kovalentní ireverzibilní selektivní inhibitor EGFR, který vytváří ireverzibilní vazbu s Cys797 s ekvivalentní nanomolární aktivitou jak na onkogenní (L858R a ex19del), tak na rezistentní (T790M) formy EGFR (Lelais *et al*, 2016). Všechny tyto látky jsou nyní v klinickém testování.



Obr. 11: a) Schéma vývoje nazartinibu, b) Vývoj série pyrazolo[3,4-d]pyrimidinů.

Některé výše zmíněné inhibitory se staly odrazovým můstkem pro sérii pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinů (Obr. 11b), které vykazují mikromolární aktivitu pro inhibici EGFR (IC₅₀ = 4,18 – 35,88 μ M; Bakr *et al*, 2012; Abdelgawad *et al*, 2016).

Pomocí racionálního designu byl objeven inhibitor třetí generace PF-06459988 (Obr. 12a) s nanomolární účinností proti rezistentním mutantům EGFR (T790M/L858R a T790M/Del) a vynikající selektivitou (minimální účinek na standardní EGFR; Cheng et al, 2016). Jeho vývoj byl zahájen screeningem asi 20 000 látek, mezi nimiž byl identifikován 2,6,9-trisubstituovaný purinový inhibitor (2, Obr. 12a), který vykazuje aktivitu proti T790M/L858R s IC₅₀ = 78 nM a 76 krát vyšší selektivitu (mutantní vs. standardní forma). Optimalizací byla připravena látka 7 (L858R $IC_{50} = 7 nM$; Obr. 12a) obsahující fluor ve své struktuře, který interaguje pomocí dipol-dipol interakcí s Phe723 v G-smyčce, čímž se zvyšuje interakce s proteinem a také podstatně zvyšuje účinnost. Nicméně zavedení fluoru má negativní vliv na selektivitu, jelikož Phe723, se kterým fluor interaguje, se nachází napříč celým kinomem (67 % kinas). Proto se pro zvýšení selektivity nabízí residuum Leu792, jelikož mnoho kinas (59 %) obsahuje v tomto místě rozměrný fenylalanin nebo tyrosin. Proto byla do struktury zavedena methoxy skupina, která dle očekávání zvýšila selektivitu. Pro snížení inhibice standardní formy EGFR se vhodnou jeví modifikace pozice N9. Proto byl připraven methylový derivát 21 (PF-06747775; Obr. 12a), který vykazuje aktivitu proti čtyřem mutantním formám EGFR (exonová delece 19, L858R a dvojité mutace T790M/L858R a T790M/Del) a selektivitu vůči standardní formě EGFR. Tato látka se v současnosti nachází v I. fázi klinického testování (Planken et al, 2017).

Zcela odlišné uspořádání substituentů na purinovém skeletu a s tím související naprosto odlišný způsob orientace v aktivním místě, mají i další inhibitory EGFR. Virtuální screening více než 650 000 známých inhibitorů kinas vedl k identifikaci 2,8-disubstituovaného purinu 1 (Obr. 12b), který inhibuje relativně dobře EGFR L858R (IC₅₀ = 98 nM) a EGFR L858R/T790M (IC₅₀ = 978 nM). Optimalizací struktury 1 byla připravena série 2,8-dianilinopurinů s dalším substituentem v poloze *N9*. Nejúčinnějším derivátem byla látka **9e** (IC₅₀ = 0,01 nM; Obr. 12b), která má subnanomolární účinnost na buněčné linii HCC827, která se vyznačuje aktivační mutací v EGFR. Méně účinná je také

na buněčné linii H1975 (IC₅₀ = 0,36 μ M), která obsahuje mutaci T790M (Yang *et al*, 2012).



Obr.12: a) Vývoj některých inhibitorů EGFR, b) Vývoj 2,8-disubstituovaných purinů jako inhibitorů EGFR.

5.2. Inhibitory nereceptorových tyrosinových kinas



Obr. 13: Doménová organizace některých rodin NRTK. Převzato z Gocek et al, 2014.

Nereceptorové tyrosinkinasy jsou zapojené do transdukce signálů pocházející z extracelulárního prostředí a často interagují s transmembránovými receptory, nebo jsou jimi aktivovány. Jsou tedy důležitou komponentou signálních drah, které regulují základní buněčné funkce, jako je diferenciace, apoptosa, přežití a proliferace. Deregulace nebo nadměrná exprese řady NRTK je typická pro některé formy rakoviny. NRTK jsou rozděleny do devíti hlavních rodin založených na jejich doménové strukturní podobnosti (Obr. 13). Katalytická (SH1, kinasová), p-Tyr vázající (SH2) a protein-protein interagující (SH3) domény sdílí vysoký stupeň homologie (Gocek *et al*, 2014).

5.2.1. Inhibitory Src

Src kinasy jsou pravděpodobně nejvíce prostudovanou skupinou nereceptorových TK čítající u savců jedenáct členů. Deregulace, nadměrná exprese nebo mutace těchto kinas byly nalezeny a studovány v mnoha lidských malignitách jako je rakovina prsu, tlustého střeva a karcinomu pankreatu. Proto se tyto kinasy staly atraktivním cílem pro design nových terapeutických látek proti různým onemocněním, zejména proti rakovině a onemocnění kostí (Rucci *et al*, 2008).

Velmi účinné inhibitory Src byly získány optimalizací inhibitorů jiných kinas. 2,6,9trisubstituované puriny, připravené původně jako silné inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK), posloužily jako základ pro vývoj pyrolopyrimidinových a pyridopyrimidinových derivátů. Optimalizací **purvalanolu A** (Src: $IC_{50} = 0.24 \mu M$, Obr. 14) byly připraveny účinné inhibitory Src jako AP23464 (IC₅₀ = 0,4 nM; O'Hare *et al*, 2004) a AP23451 (IC₅₀ = 67 nM; Shakespeare *et al*, 2008). Látka AP23464 (Obr. 14) vykazuje velice silnou aktivitu proti Src, 500x krát silnější než purvalanol A, ale 300x krát slabší aktivitu proti CDK2 (IC₅₀ = 20,9 μ M). Vysoká afinita této látky k Src je pravděpodobně zapříčiněna dvěma faktory: za prvé, přítomností objemného substituentu v poloze N9, který vytváří polární a hydrofóbní interakce s rezidui v aktivním místě Src a za druhé výskytem fosfinoxidu v poloze C6 na purinu, který tvoří vodíkovou vazbu s postranním řetězcem Tyr340 (Dalgarno et al, 2006). Modifikací AP23464 byla připravena série 4-amino-tetrahydroquinazolino (3,2-e)purinových derivátů, které však svou aktivitou patří do středně účinných inhibitorů Src (Obr. 14; Verones et al. 2010).



Obr. 14: Vývoj inhibitorů Src (Summy et al, 2005).

Látka AP23464 však byla později modifikována úspěšněji, kdy byly připraveny látky jako AP23848 (IC₅₀ = 0,4 nM), AP23846 (IC₅₀ = 0,5 nM) a AP23980 (IC₅₀ = 6,5 nM; Obr. 14; Summy *et al*, 2005).

Screeningem knihovny purinových látek byly nalezeny dvě látky vykazující aktivitu proti Src, které se staly výchozím bodem pro další vývoj nových inhibitorů. Počítačovým modelováním byly navrženy fragmenty do pozic C6 (fragment A – celkem 15) a C2 purinu (fragment B – celkem 8), které by mohly tvořit interakce mezi ligandem a Src kinasou. Výsledkem projektu bylo 308 kandidátů z celkových 480, z nichž bylo pro syntézu a ověření aktivity vybráno pouze 32. Tyto látky vykazovaly hodnoty IC₅₀ v rozmezí pouze od 0,02 μ M do 3,14 μ M. Nejúčinnější látkou z této série byla látka **5i** (IC₅₀ = 0,02 μ M) s 120x vyšší aktivitou než látka **1a** (Obr. 15; Huang *et al*, 2010).



Obr. 15: Vývoj 2,6-disubstituovaných purinových inhibitorů Src.

Src kinasy hrají důležitou roli také ve fyziologii osteoklastů a osteoblastů. Podílí se na remodelaci kostí (resorpce a tvorba), ale také v patofyziologii kostních onemocnění, včetně osteoporózy, revmatoidní artritidy a dalších. Bylo zjištěno, že Src patří mezi důležité negativní regulátory aktivity osteoblastomů a naopak jako mediátory antiapoptické signalizace vyvolané pohlavními steroidy v osteoblastech. Díky tomu mají inhibitory Src vysoký potenciál i v léčbě onemocnění spojených s kostními chorobami a metastazováním do kostí. Bylo zjištěno, že bisfosfonáty vykazují výjimečnou afinitu ke kostní tkáni, proto je tato funkční skupina využívána při designu modulátorů funkcí kostí (Wang *et al*, 2003). Mezi purinové deriváty s touto skupinou, začleněnou v jejich struktuře, patří látka **AP23317** (IC₅₀ = 41 nM; Obr. 16a; Wang *et al*, 2003) a **AP23451** (IC₅₀ = 67 nM; Obr. 16b; Shakespeare *et al*, 2008).



Obr. 16: a) struktura látky AP-23317, b) vývoj látky AP-23451.

5.2.2. Inhibitory Bcr-Abl/ Src-Abl

Rodina cytoplazmatických tyrosinových kinas Abl obsahuje dva členy Abl a Arg (Ablrelated gene), které jsou kódované geny ABL1 a ABL2 (Pendergast, 2002). U lidí jsou Abl kinasy zahrnuty v mnoha chromozomálních abnormalitách u různých rakovin, které vedou k expresi fúzních proteinů; aktivační bodové mutace dosud nebyly žádné identifikovány. Fúzní partner přispívá sekvencí, která řídí dimerizaci nebo multimerizaci kinasy (Smith and Van Etten, 2001). Obecně platí, že fúze vede ke ztrátě autoinhibiční schopnosti kinasy odstraněním myristoylačního místa a v některých případech i SH2 a SH3 domény (Barilá and Superti-Furga, 1998; Hantschel *et al*, 2003).



Obr. 17: Schématické znázornění ABL1 a fúzního proteinu BCR-ABL1 (Hantschel and Superti-Furga, 2004).

Filadelfský (Ph) chromozom, který vzniká reciprokou translokací chromozomů 9 a 22, patří k nejčastějším cytogenetickým aberacím u hematologických poruch. Tento chromozom kóduje Bcr-Abl protein (Obr. 17), který vzniká fúzí genů ABL1 (chromozom 9) a BCR (chromozom 22; Deininger *et al*, 2000). Exprese fúzního proteinu Bcr-Abl má několik důsledků. Bcr silně podporuje dimerizaci proteinu, přičemž Abl kinasová doména se autofosforyluje, stává katalyticky velmi aktivní a aktivuje řadu substrátových proteinů. Bcr část navíc slouží jako interakční motiv pro řadu proteinů se SH2 a PTB doménami, které jsou v důsledku toho nepřirozeně silně aktivovány (Brehme *et al*, 2009; Hantschel, 2012). Abnormální interakce mezi Bcr-Abl a dalšími cytoplazmatickými proteiny, vede k narušení klíčových buněčných procesů, včetně MAPK, JAK-STAT a PI3K/AKT signalizačních drah podporujících proliferaci a potlačujících apoptosu (Melo and Deininger, 2004).

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se kinasa Abl stala významným cílem antileukémických inhibitorů, které jsou již od roku 2001 využívány klinicky. Existují tři využívané způsoby inhibice signalizace Abl; ATP-kompetitivní, alosterická nebo inhibice signálních drah podřízených Abl. Prvním klinicky využívaným inhibitorem Bcr-Abl se stal **imatinib**. Podávání imatinibu vede k trvalé remisi u většiny pacientů s CML a dramaticky zlepšuje jejich celkové přežití (Hochhaus et al, 2009). Nicméně výskyt bodových mutací v doméně Bcr-Abl kinasy je hlavní příčinou získané rezistence a komplikuje dlouhodobou léčbu (Soverini et al, 2011). Ve snaze překonat tyto nedostatky byly vyvinuty látky nilotinib (Weisberg et al, 2005) a dasatinib (Shah et al, 2004), které inhibují většinu běžných bodových mutací způsobujících rezistenci k imatinibu, ovšem kromě nejběžnější mutace T315I (Saglio et al, 2010) (Kantarjian et al, 2010). Mezi novější látky, které překonávají i tuto mutaci, patří **ponatinib** a **DCC-2036** (O'Hare *et al*, 2009; Chan *et al*, 2011). Nilotinib má podobnou strukturu jako imatinib a sdílí stejné vazebný mód a vysokou specifitu. Naopak dasatinib je odlišný jak strukturně, tak ve vazebném módu a ve farmakokinetických vlastnostech. Dasatinib má navíc poměrně širokou specifitu a inhibuje rodiny Scr, Tec a další. (Hantschel et al, 2007).

Vzhledem k tomu, že Abl sdílí významnou podobnost aktivní konformace se Src, tak mnoho inhibitorů vyvinutých jako inhibitory Src, vykazuje i silnou inhibici Abl kinasy. Typickými příklady jsou např. **AP23846** (IC₅₀ = 21 nM; Obr. 14; Summy *et al*, 2005) nebo **AP23464** (IC₅₀ <1 nM pro obě kinasy; Obr. 14; O'Hare *et al*, 2004). Krystalová struktura této látky v Src posloužila jako vodítko pro další vývoj inhibitorů Abl (Dalgarno *et al*, 2006). Bylo například zjištěno, že dvojná vazba v substituentu v poloze *N9* purinu naorientuje 2,6-disubstituovaný fenylový kruh (**AP24149**; Obr. 18a) do selektivní kapsy Src/Abl (Lombardo *et al*, 2004; Noronha *et al*, 2007). Záměna fenylu za 4-substituovaný indazol podporuje interakci s Abl vytvořením dalších vodíkových vazeb (**AP24283**; Obr. 18a; Zhou, 2009).



Obr. 18: a) vývoj látky AP24283, b) vývoj látky AP24163.

AP24283 (Obr. 18a) se váže do DFG-in módu a bylo zjištěno, že důležitým elementem pro interakci s Abl nejsou jen dvě vodíkové vazby methylindazolu, ale přímo i methylová skupina (Zhou *et al*, 2010). Kombinací **AP24283** a nilotinibu byl připraven inhibitor **AP24163** (Obr. 18b), který obsahuje v pozici *N9* objemný substituent shodný se substituentem v nilotinibu. Na rozdíl od nilotinibu ale tato látka vykazuje aktivitu proti mutantní formě T315I (Zhou *et al*, 2010).

5.2.3. Inhibitory Bruton kinasy

Brutonova tyrosinová kinasa (BTK) je nereceptorová TK spadající do TEC rodiny kinas. TEC kinasy jsou druhou největší skupinou cytoplasmatických TK a zahrnují BTK, Tec, Itk, Txk a Bmx. BTK jsou primárně exprimovány v hematopoetických buňkách, zejména v B-buňkách, nikoliv však v T-buňkách nebo normálních plazmatických buňkách. BTK mají zásadní význam pro vývoj B-lymfocytů, což bylo prokázáno u pacientů s agamaglobulinémií (Mohamed *et al*, 2009).

Vzhledem k tomu, že BTK jsou kritickým efektorem ve vývoji B-buněk a hrají hlavní roli v lymfomagenezi, byly zkoumány inhibitory BTK jako potenciální léčiva pro imunitní poruchy. Typickým rysem aktivního místa BTK je přítomnost cysteinového zbytku 481 v alosterickém inhibičním segmentu kinasové domény. Zajímavou možností je proto navrhnout takové inhibitory, které by se specificky vázaly do tohoto místa a vytvářely zde kovalentní vazbu s proteinem. Prvním ireverzibilním inhibitorem BTK se stal ibrutinib $(IC_{50} = 0,5 \text{ nM}; \text{Obr. 19a})$, který patří mezi inhibitory první generace a váže se na zbytek cysteinu 481. Nejedná se ale o selektivní inhibitor, jelikož vykazuje signifikantní aktivitu i proti dalším 19 kinasam (např. EGFR, JAK3, BLK). Ibrutinib byl schválen pro léčbu chronické lymfocytické leukémie, lymfomu z plášťových buněk a Waldenströmovy makroglobulinémie (Grisafi et al, 2015; Castillo et al, 2016). Nicméně řada nežádoucích vedlejších účinků vedla k vývoji inhibitorů druhé generace (Obr. 19a), kam patří ireverzibilní ACP-196 (acalabrutinib, IC₅₀ = 3 nM), který se nachází ve III. fázi klinického testování a purinový derivát ONO/GS-4059 (IC₅₀ = 2,2 nM). Oba inhibitory jsou silnější a selektivnější inhibitory BTK s minimem vedlejších účinků v porovnání s ibrutinibem (Wu et al, 2016).

Další skupinou inhibitorů BTK jsou reverzibilní inhibitory na bázi purinu a purinových isosterů (Obr. 19b). Jako výchozí sloučeniny pro vývoj těchto inhibitorů byly použity deriváty imidazo[1,2-*a*]-pyrazinu (1, Obr. 19b), kdy systematickými změnami pozic dusíků bylo zjištěno, že nejvhodnějším skeletem je právě purin. Následnou optimalizací substituentů v jednotlivých pozicích došlo k přípravě velmi účinné látky **BMS-809959** (IC₅₀ = 8 nM; Obr. 19b). Na základě krystalové struktury **BMS-809959** v komplexu s BTK bylo zjištěno, že *N7* purinového jádra a NH C6 anilinové skupiny vytváří vodíkové vazby s Met477. Další specifickou interakcí je *tert*-butyl benzamidová

35

skupina v pozici C2, která vytváří nejen hydrofobní interakce, ale i vodíkovou vazbu. Tyto interakce pravděpodobně přispívají k vysoké účinnosti této látky (Shi *et al*, 2014).



Obr. 19: a) struktury látek Ibrutinibu, Acalabrutinibu a ONO/GS-4059, b) vývoj látky BMS-809959.
5.2.4. Inhibitory Janusovy kinasy

Janusovy kinasy jsou rodina relativně velkých (120-130 kDa) intracelulárních tyrosinových kinas, jejichž funkcí je zprostředkovávání přenosu signálu z cytokinového receptoru. Jméno je převzato od boha Januse z římské mytologie, který je obvykle zobrazován se dvěma opačnými tvářemi. Je to proto, že tyto kinasy mají dvě téměř identické fosfotransferové domény. JAK mají zásadní roli ve vrozené a získané imunitě, stejně jako v hematopoéze. Mutace v JAK jsou spojovány s mnoha rakovinami, myeloproliferativními a zánětlivými onemocněními, čímž se stávají atraktivními cíli. Jsou známy čtyři členy JAK rodiny: JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2. Důležitým elementem funkce JAK je párování těchto kinas, které jsou asociovány s intracelulárními doménami různých podjednotek receptoru. Různými kombinacemi párování JAK má za následek různé biologické funkce v rámci signalizace. Proto je v případě JAK důležitá selektivní inhibice, aby nedocházelo k modulaci aktivity jiných signálních drah, což by mohlo mít nežádoucí vedlejší účinky (Clark *et al*, 2014).

JAK kinasy se obecně účastní JAK/STAT signalizace. Po vazbě cytokinu na receptor a konformačním změnám se JAK aktivují a stávají se fosforylované zejména na tyrosinových zbytcích. Takto aktivované JAK fosforylují specifické tyrosinové zbytky v intracelulární doméně receptoru a vytvářejí vazebná místa pro STAT. Vazba STAT na receptor umožnuje fosforylaci STAT JAK kinasami, což vede k jejich dimerizaci a následné migraci do jádra, kde se váží na specifická DNA vazebná místa a regulují transkripci, která vede ke změnám v buněčných procesech (Murray, 2007).

Inhibitory JAK mohou být rozděleny do tří kategorií v závislosti na rozdílech mezi homologními subtypy JAK proteinu a interakcemi mezi inhibitory a JAK. První skupinou jsou pan-JAK inhibitory, které mají podobný stupeň inhibice vůči JAK1-3. Druhým typem jsou selektivní inhibitory, které inhibují především JAK2 a používají se pro protinádorovou léčbu. Třetí skupinou jsou selektivní inhibitory JAK3 a ty se používají při léčbě zánětů a imunosupresivní léčbě. I přesto, že byly popsány inhibitory všech JAK kinas a jsou známy vztahy mezi sktrukturou a aktivitou, je objev inhibitorů stále výzvou z důvodu vysoké strukturní podobnosti těchto enzymů. Jednotlivé isoformy JAK se totiž liší pouze v 9 aminokyselinách z celkových 120 obsažených v ATP-vazebné doméně (J Jiang, 2014).

První generace inhibitorů JAK jsou malé neselektivní molekuly, které byly nahrazeny inhibitory druhé generace, které mohou inhibovat jednotlivé proteiny JAK

s vysokou selektivitou. Inhibitory první generace mohou být rozděleny dle struktur inhibitory pyrrolopyrimidinové (ruxolitinib, tasocitinib, baricitinib), na pyrrolopyridinové a pyrrolopyrazinové. Ruxolitinib (Obr. 20c) byl schválen pro léčbu myelofibrózy a nachází se v klinickém testování v souvislosti s různými typy rakoviny a lupénky. Jedná se o pan-inhibitor JAK1 (IC₅₀ = 3,3 nM), JAK2 (IC₅₀ = 2,8 nM) a JAK3 (IC₅₀ = 428 nM; Harrison and Vannucchi, 2012). **Tasocitinib** (Obr. 20a) je silný inhibitor JAK1 (IC₅₀ = 3,2 nM), JAK2 (IC₅₀ = 4,1 nM) a JAK3 (IC₅₀ = 1,6 nM) a byl schválen pro léčbu revmatoidní artritidy a je klinicky testován pro léčbu lupénky (III.fáze), Crohnovy choroby (II.fáze) a dalších. Tato látka byla vyvinuta high throughput screeningem, během něhož byl identifikován pyrrolopyrimidinový derivát, který byl následně optimalizován. Díky tomu má tasocitinib značnou inhibiční aktivitu, která je dána vysokým stupněm komplementarity této látky v aktivním místě JAK (Clark et al, 2014). Mezi další inhibitory JAK patří filgotinib (Obr. 20b), inhibitor JAK1 (IC₅₀ = 10 nM) a potenciální léčivo pro revmatoidní artritidu a Crohnovu nemoc (Menet et al, 2014; Vermeire et al, 2017). Dále například oclacitinib (JAK1: IC₅₀ = 10 nM, Obr. 20c; Gonzales et al, 2014) a gandotinib (JAK2: IC₅₀ = 3 nM, Obr. 20c; Ma et al, 2013). Druhá generace zahrnuje látky jako lestaurtinib a AZD1480, které však neobsahují purin ani jeho isoster ve své struktuře (J Jiang, 2014).

V mnoha lidských nádorech byla zjištěna aberantní aktivita některých STAT proteinů (STAT3). I přesto, že se nejedná o kinasy, je třeba zmínit, že STAT se staly cílem i některých trisubstituovaných purinových inhibitorů. Pomocí výpočetních studií byly nalezeny zajímavé purinové struktury s afinitou k purifikovanému STAT3, které snižovaly intracelulární fosforylaci pY705-STAT3 v mikromolárním rozsahu (látky **39** a **26**; Shahani *et al*, 2011). 3D strukturní modelování ukázalo, že se puriny mohou vázat do SH2 domény STAT3 a zabránit tak jejich dimerizaci a buněčné funkci (Shahani *et al*, 2011). Druhá generace těchto látek byla připravena za účelem zlepšit buněčnou penetraci a biologickou účinnost na STAT3. Byla připravena látka **22e** (Obr. 20d), která vykazuje vysokou cytotoxicitu v buňkách mnohočetného myelomu. Nicméně pomocí biofyzikální a biochemické charakterizace této látky bylo zjištěno, že se nejedná o inhibitor STAT3, ale spíše o inhibitor JAK, ABL1 a AAK1 (Shahani *et al*, 2013).



Obr. 20: a) vývoj tasocitinibu, b) vývoj filgotinibu, c) struktury některých inhibitorů JAK kinas, d) vývoj látky 22e.

6. INHIBITORY SERIN/THREONINOVÝCH KINAS

6.1. Inhibitory PAK

P21-aktivované protein kinasy (PAK) jsou serin/threoninové protein kinasy, které regulují buněčnou motilitu, adhezi a dynamiku cytoskeletu. Šest členů PAK rodiny se dělí do dvou skupin, skupiny I (PAK1-3) a skupiny II (PAK4-6), na základě sekvenční homologie a odlišnosti v autoinhibiční oblasti (Kumar *et al*, 2006). PAK jsou hlavními signálními přenašeči v několika onkogenních drahách včetně Rad, Raf, Akt, Bad a p53. Vzhledem k tomu, že jsou i efektory podřízenými Rho GTPase Cdc-42, Rac1 a RhoA, řídí reorganizaci aktinového cytoskeletu. Mimoto se PAK1 podílí na regulaci drah růstových faktorů, buněčné proliferace a signalizaci související s přežitím (Rudolph *et al*, 2016). Nejvíce prostudovaným členem rodiny II je PAK4, který byl nalezen nadměrně exprimován, bodově mutován a amplifikován v mnoha nádorových buněčných liniích a tumorech, a proto je studován jako potenciální protinádorový cíl (Rudolph *et al*, 2015).

Kinasy jsou známé jako extrémně dynamické molekuly, které mohou zaujímat velké množství konformací. Tato plasticita je realizována množstvím pohybů mezi a uvnitř dvou kinasových domén, které jsou esenciální pro regulaci enzymové aktivity. ATP a ATP-mimetické inhibitory stabilizují uzavřené aktivní konformace. Za účelem objasnění způsobu inhibice PAK byl použit 2,6,9-trisubstituovaný purinový inhibitor **CGP74514A** (Obr. 21), který byl dříve identifikován jako silný inhibitor CDK a Src. CGP74514A byl krystalizován s PAK4 a PAK5 a bylo zjištěno, stabilizuje jejich uzavřené aktivní konformace. Navíc vytváří dvě vodíkové vazby s rezidui Leu239 pomocí *N*⁶ a *N7* a několik hydrofobních interakcí, které stabilizují jeho pozici v aktivním místě. I přesto, že je CGP74514A slabý inhibitor PAK, poskytl cenné informace o struktuře PAK a stal se tak výchozím bodem pro další vývoj silnějších a selektivnějších inhibitorů (Eswaran *et al*, 2007). Několik příkladů bude uvedeno níže.



Obr. 21: Vývoj PAK inhibitorů. Červeně jsou znázorněny dusíky vytvářející vodíkové vazby.

První PAK inhibitor, který se dostal do I. fáze klinického testování je **PF-3758309** (Obr. 21; Murray *et al*, 2010). Byl racionálně navržen právě na základě informace o orientaci purinového inhibitoru v aktivním místě. Tento pyrrolopyrazolový inhibitor je pan-PAK inhibitor inhibující všechny PAK II. skupiny s IC₅₀ kolem 20 nM a s různou aktivitou proti PAK I. skupiny (PAK2: IC₅₀ = 190 nM, PAK3: IC₅₀ = 99 nM). Bohužel klinické testování odhalilo nízkou biologickou dostupnost a neutropenii (Rudolph *et al*, 2015).

Další skupinou PAK inhibitorů jsou látky z pyridopyridiminové série. **FRAX597** (Obr. 21) je silný selektivní ATP-kompetitivní inhibitor I skupiny PAK (1-3) s biochemickými hodnotami IC₅₀: PAK1 IC₅₀= 8 nM, PAK2 IC₅₀ = 13 nM, PAK3 IC₅₀ = 19 nM. Hodnota IC₅₀ pro PAK4 je vyšší než 10 µM. Na základě krystalové struktury této látky s PAK1 bylo zjištěno, že pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-on je umístěn v aktivním místě stejně jako adeninová báze ATP a určuje orientaci celé sloučeniny. Pro porozumění specifičnosti FRAX597 byly srovnány struktury několika inhibitorů v komplexu s PAK1 a PAK4. To odhalilo, že ačkoliv architektura ATP vazebných míst vykazuje vysokou podobnost u obou kinas, zadní dutina PAK4 je stlačenější než v PAK1. Toto zúžení v PAK4 je z velké části způsobeno zbytky Met395 a Lys350, které jsou ve výrazně jiných konformacích než

u PAK1. To může vysvětlovat proč FRAX597 s velkou 2-chlor-4-(thiazol-5-yl)fenylovou skupinou nevykazuje při 100 nM koncentraci detekovatelnou inhibici PAK4, zatímco stejná koncentrace této látky inhibuje více než 80 % aktivity PAK1 (Licciulli *et al*, 2013).

6.2. Inhibitory CK1

U savců bylo charakterizováno 7 isoforem kaseinkinasy 1 (CK1 α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ε), které jsou v jejich kinasových doménách vysoce konzervované, ale odlišné v délce a sekvenci jejich N- a C-terminálních částí (Knippschild *et al*, 2005). Stále narůstající počet identifikovaných substrátů pro CK1 a jejich strukturní rozmanitost naznačuje, že CK1 jsou zahrnuty v regulaci mnoha buněčných procesů jako je Wnt signalizace, cirkadiánní rytmy, membránový transport, aktinový cytoskelet a odpověď na poškození DNA (Bibian *et al*, 2013). Aberantní aktivita CK1 δ a CK1 ϵ je spojována s neurogenerativními nemocemi (Alzheimerova a Parkinsonova choroba) (Hanger *et al*, 2007; Perez *et al*, 2011), poruchami spánku (Shanware *et al*, 2011) a zánětlivými onemocněními (Luz *et al*, 2011). Kromě toho jsou vysoce exprimované u některých rakovin (rakovina prsu a vaječníků, adenokarcinoma pankreatu) a kontrolují růst, apoptosu, metabolismus a diferenciaci nádorových buněk (Oumata *et al*, 2008).

Vzhledem k funkci CK1 v mnoha onemocněních se inhibitory CK1 staly dalším potenciálním cílem při léčbě těchto chorob. Doposud bylo objeveno několik ATP-kompetitivních inhibitorů jak přírodního, tak syntetického původu. Tyto látky byly navrženy na základě krystalografických studií, virtuálního i klasického screeningu. Nicméně žádný z těchto inhibitorů se ještě nedostal do klinického testování (Perez *et al*, 2011).

CK1 spolu s cyklin-dependentními kinasami jsou zapojeny i v Alzheimerově chorobě. Mezi dvě hlavní příčiny tohoto onemocnění patří produkce β -amyloidu a hyperfosforylace Tau proteinu. Tato deregulace je způsobena několika kinasami, a to CDK5, CDK1, GSK3, CK1 a DYRK1A (Demange *et al*, 2013b). Díky znalosti, že roskovitin částečně inhibuje i CK1 a DYRK1A, byla připravena série derivátů roskovitinu, kam patří i látka (*R*)-DRF053 (Obr. 22b). Tento dosud nejúčinnější CK1 inhibitor inhibuje CK1 při koncentraci 14 nM a vykazuje i jistou aktivitu proti CDK5 (IC₅₀ = 80 nM), CDK1

 $(IC_{50} = 0,22 \ \mu M)$ a GSK-3 $(IC_{50} = 4,1 \ \mu M)$. Molekulární modelování ukázalo, že ve vazebném místě CK1 dochází k tvorbě vodíkových vazeb mezi purinovým dusíkem 6 jakožto donorem a dusíkem 7 jakožto akceptorem. Zlepšená afinita 3- a 4- pyridinylových derivátů vůči CK1 ve srovnání s deriváty roskovitinu je pravděpodobně dána interakcí mezi pyridinovým kruhem a Arg13. Duální inhibice CDK/CK1 by mohla být využita při léčbě Alzheimerovy choroby a rakoviny, jelikož se CDK podílejí na hyperproliferaci buněk a CK1 potlačují apoptotickou signalizaci a modulují aktivitu a interakce nádorových supresorů a onkogenů (Demange *et al*, 2013).

Pomocí high-throughput screeningu bylo identifikováno několik dalších purinových inhibitorů CK1, a to látka **SR-653234** a **SR-1277** (Obr. 22a). Kvůli nízké rozpustnosti látky SR-1277 a ve snaze zlepšit antiproliferační účinky, byly připraveny látky jako **SR-2890** a **SR-3029** (Obr. 22a), které mají vyhovující výsledky v *in vitro* a *in vivo* testech a potenciální použití v léčbě nádorů mozku (Bibian *et al*, 2013). Mezi další inhibitory CK1 patří **PF-4800567** (Obr. 22b). Nejedná se však o trisubstituovaný purin, ale jeho isoster pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin. Jednou z velkých výhod této látky je vysoká selektivita vůči CK1 ϵ (IC₅₀ = 32 nM) a 22x nižší aktivita na CK1 δ (IC₅₀ = 711 nM). Experimenty využívající právě tento inhibitor identifikovaly CK1 δ jakožto významný mediátor v cirkadiánních rytmech (Walton *et al*, 2009).



Obr. 22: a) vývoj látek SR-3029 a SR-2890, b) struktura látek DRF053 a PF-4800567.

6.3. Inhibitory BRAF

BRAF kinasy jsou serin/threoninové kinasy, které hraji důležitou úlohu v regulaci Ras/Raf/MEK/ERK signální kaskády, která řídí buněčné dělení, diferenciaci a růst. Mutace genu BRAF jsou asociovány s řadou nádorů (melanom, kolorektální karcinom, thyroidní papilární karcinom, karcinom vaječníků, vlasatobuněčná leukémie) a jsou většinou způsobeny aminokyselinovou záměnou u aminokyselinového zbytku 600 (V600E mutace). Tato mutace konstitutivně aktivuje BRAF a signální dráhy spojené s MAPK. Proto se inhibice aktivity BRAF stala dalším slibným cílem při léčbě rakoviny (Park *et al*, 2011).

Také při vývoji inhibitorů BRAF a jeho mutantní formy V600E napomohly informace o 3D struktuře a charakteristických interakcích v ATP-vazebném místě. Většina těchto inhibitorů však byla objevena díky high throughput screeningu nebo modifikacemi existujících inhibitorů. Jedním z nejvýznamnějších inhibitorů BRAF je klinicky studovaný **vemurafenib** (IC₅₀ = 31 nM; Obr. 23a). Existuje však také několik inhibitorů s purinovým základem. Park et al. (2011) provedli screening okolo 240 000 látek a byly vybrány pouze ty látky (200), které splňovaly Lipinského pravidlo pěti (Lipinski, 2004) a látky bez reaktivních funkčních skupin (Park *et al*, 2011). Z těchto 200 látek bylo aktivních pouze 6 z nich s hodnotami IC₅₀ od 0,7-2,1 μ M, včetně jednoho purinového derivátu IC₅₀ = 0,7 μ M (Obr. 23b). V návaznosti na tuto studii byla provedena optimalizace, kdy výsledkem bylo 91 derivátů purinu s aktivitou na BRAF, přičemž nejúčinnější látka vykazovala hodnotu IC₅₀ = 0,43 μ M (Obr. 23b; Park *et al*, 2012).

Dále byla popsána série 2,6-dion-purinů s mikromolární aktivitou a výraznou selektivitou proti BRAF. Hight-throughthout screeningem byla vybrána látka **1** (Obr. 23c) obsahující dvě methylpyridinové skupiny a hexahydropteridinové jádro. Molekulární modelování ukázalo, že silné hydrofobní interakce s BRAF jsou způsobeny pouze jednou ze dvou přítomných methylpyridinových skupin. Proto byla připravena látka **1a** (Obr. 23c) obsahující pouze jednu tuto skupinu. Látka **1a** se stala výchozí látkou pro novou sérii derivátů, kde nejúčinnější látkou byla látka **19** (IC₅₀ = 2,1 μ M; Obr. 23c) a nejvíce selektivní **24** (IC₅₀ = 1,7 μ M; Obr. 23c; Luo *et al*, 2008).



Obr. 23: a) struktura vermurafenibu, b) vývoj purinových inhibitorů BRAF, c) vývoj série 2,6-dionpurinů.

6.4. Inhibitory CDK

Cyklin dependentní kinasy jsou serin/threoninové kinasy hrající významnou roli zejména v regulaci buněčného cyklu. Deregulace buněčného cyklu nádorových buněk je těsně spjata s aberantní aktivitou CDK. Tato aktivita může být způsobena mutací/overexpresí CDK nebo mutací genů kódující proteiny, které ovlivňují aktivitu CDK jak přímo, tak nepřímo (Coxon *et al*, 2017). CDK můžeme rozdělit do dvou skupin: na ty, které regulují buněčný cyklus (CDK1-4, CDK6) a na ty, které regulují transkripci (CDK7-9, CDK11-13). Mechanismus regulace CDK je zprostředkován asociací s cykliny, což může vést ke konformačním modifikacím, například 90° otočení PSTAIRE α-helixu. Tento α-helix v aminoterminální smyčce v CDK po vazbě cyklinu změní svoji pozici, což má za následek reorientaci klíčových reziduí v aktivním místě CDK. Mezi další možnosti regulace patří aktivace/inhibice pomocí fosforylace a také pomocí přirozených inhibitorů CDK. Tyto inhibitory mohou inhibovat CDK (p15, p16, p18, p19) nebo komplexy CDK/cyklin (p21, p27, p57; Mariaule and Belmont, 2014).

Většina známých CDK inhibitorů jsou *ATP-kompetitory* interagující s CDK v jejich katalytickém místě. Struktury těchto molekul jsou poměrně různorodé a jsou odvozeny od mnoha heterocyklů, jako jsou například puriny, pyrimidiny, indoly, pyrazoly, thiazoly (Malínková *et al*, 2015). Několik z nich se dostalo i do klinického testování jako potenciální protinádorová terapeutika, včetně purinového roskovitinu a jemu podobnému **dinaciclibu** (SCH-727965; Obr. 24a), který se nachází již ve III. fázi klinického testování (Mariaule and Belmont, 2014). Palbociclib (PD0332991) a ribociclib (LEE-011) byly dokonce již jako léčiva schválena (Obr. 24a; Clark *et al*, 2016; Tripathy *et al*, 2017).

Historie purinových CDK inhibitorů sahá do 90. let 20. století, kdy byl objeven první **olomoucin** (IC₅₀ = 7 μ M) odvozený od isopentenyladeninu (Obr. 24b; Veselý *et al*, 1994). Optimalizací jeho struktury se podařilo připravit *R*-roscovitin (CDK2: IC₅₀ = 0,7 μ M; Havlíček *et al*, 1997) a látku **CR8** (IC₅₀= 41 nM; Obr. 24b; Bettayeb *et al*, 2008). Na základě krystalových struktur CDK2 v komplexu s roskovitinem (De Azevedo *et al*, 1997) a CDK5/p25 (Mapelli *et al*, 2005) bylo prokázáno, že se roskovitin váže do vazebného místa pro ATP, kde kompetuje s ATP. Od té doby došlo k optimalizaci struktur purinu a doposud byla připravená celá řada inhibitorů CDK na bázi purinu (Zatloukal *et al*, 2013; Demange *et al*, 2013; Trova *et al*, 2009; Dreyer *et al*, 2001; Gucký *et al*, 2013; Park *et al*, 2017) nebo jeho isosterů (Popowycz *et al*, 2009; Jorda *et al*, 2011).



Obr. 24: a) ATP-kompetitivní inhibitory CDK ve III. fázi klinického testování, b) Vývoj purinových inhibitorů CDK.

Další skupina purinových inhibitorů je charakteristická odlišným typem substituce v polohách 2 a 6 purinu. Typickým zástupcem je látka **NU6102** (CDK2: $IC_{50} = 6$ nM; Obr. 25). Jedná se o silný a selektivní ATP-kompetitivní inhibitor CDK2 se sulfoamidovou skupinou, která se vyskytuje v blízkosti lysinového rezidua v aktivním místě CDK2 (Davies *et al*, 2002). NU6102 vytváří tři vodíkové vazby mezi purinovým skeletem

a Leu83 s Glu81, ale na rozdíl od jiných inhibitorů CDK, jsou tyto vazby zprostředkovány N9 a N^2 , nikoliv N^6 a N7. K dalším interakcím dochází na sulfonamidové skupině, jejíž NH₂ skupina vytváří vodíkovou vazbu s Asp86 a jeden sulfonamidový kyslík je akceptorem pro vodíkovou vazbu vycházející z Asp86. Tyto vazby vedou k rotaci anilinové skupiny o 13°, což zapříčiňuje stabilizaci anilinového kruhu v aktivním místě (Obr. 25). Tato látka má nicméně vysokou hodnotu $GI_{50} = 8 \mu M$ na lidské linii MCF-7 (Davies *et al*, 2002), což může být dáno i metabolickou nestabilitou sulfoamidové skupiny (Shear et al, 1986). Proto byla připravena látka NU6155 s nanomolární inhibicí CDK2 ($IC_{50} = 5,4$ nM; Obr. 25), která se stala výchozí látkou pro vývoj ireverzibilního inhibitoru (Hardcastle et al, 2004). Vzhledem k orientaci tohoto typu inhibitorů v aktivním místě CDK byla ověřována možnost vytvoření kovalentní vazby s Lys89. Byl proto připraven derivát NU6310 (IC₅₀ = 0,16 µM; Obr. 25) s ethylsulfonylovou skupinou, která je lokalizována v těsné blízkosti Lys89, nicméně tato látka je inhibitorem reverzibilním. Další derivát NU6300 s vinylsulfonylovou skupinou je již ireverzibilní a ochotně vytváří kovalentní vazbu mezi ε-aminoskupinou Lys89 s vinylsulfonovou skupinou inhibitoru (Obr. 25; Anscombe et al, 2015).





6.5. Inhibitory PDK1

Aberantní aktivace signální dráhy PI3K/AKT je jednou z nejběžnějších molekulárních změn při iniciaci a progresi rakoviny. Z toho důvodu se řada laboratoří zabývá vývojem inhibitorů zaměřených na komponenty signální dráhy PI3K, mezi které patří jak přímo PI3K, tak i PDK1 (PI3K 3-fosfoinositin kinasa 1), AKT a mTOR (Barile *et al*, 2012). PDK1 kinasa reguluje aktivitu příbuzných kinas, jako je protein kinasa A (PKA), protein kinasa G (PKG), protein kinasy C (PKC) včetně Akt, a to fosforylací specifického threoninového nebo serinového zbytku uvnitř aktivační smyčky (T-smyčka), která je pro kinasu kritická. Mnoho kinas, které jsou aktivované PDK1, regulují buněčné procesy jako je přežití buněk, diferenciace, růst a exprese proteinů v reakci na druhého posla v signálních drahách (Medina, 2013).

Navzdory centrální roli PDK1 jako aktivátoru signální dráhy byla pozornost věnována spíše PI3K, Akt a mTOR. I přesto však inhibitory PDK1 existují (Barile *et al*, 2012). Bylo připraveno mnoho inhibitorů PDK1 odvozených od purinu a jeho isosterů (Obr. 26a), např. 3,5-diaryl-7-azaindoly (**123**), 7-aminopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny (**144**), [1,2,4]-triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5-aminy (**162**) a další (Peifer and Alessi, 2008). Skupina Blancharda objevila v rámci fragmentového screeningu makrocyklickou purinovou látku **1** (IC₅₀ = 0,39 μ M, Obr. 26b), která byla původně připravená jako inhibitor CDK2. Odstraněním linkeru, který je pravděpodobně zodpovědný za interakci s CDK, a následnou optimalizací substituentů byla připravena látka **6** (PDK1: IC₅₀ = 0,15 μ M; Obr. 26b). Další optimalizace vedly k přípravě účinnějších látek, např. látky **18** (IC₅₀ = 7,9 nM; Blanchard *et al*, 2012).



PDK1 IC₅₀ = 7,9 nM

Obr. 26: a) struktury vybraných isosterů, b) vývoj purinových inhibitorů PDK1.

Firma Pfizer otestovala celou sérii látek s potenciální aktivitou na PDK1, kdy byla identifikována látka **14** (IC₅₀ = 100 nM; Obr. 27). Na základě rentgenostrukturní analýzy bylo zjištěno, že tato látka vytváří několik vodíkových vazeb ve vazebném místě enzymu. Ve snaze zlepšit aktivitu a selektivitu této látky byl zaměněn isopropyl za lipofilnější (cyklobutyl, cyklopentyl) nebo polárnější skupiny (hydroxyethyl), které však aktivitu snižovaly. Nicméně struktura **14** se stala výchozím bodem pro další optimalizace. Látka **15** (IC₅₀ = 35 nM; Obr. 27) obsahuje ethylový linker, který se nachází v synklinální konformaci, která se zdá být nezbytná pro efektivní vyplnění kapsy pod G-smyčkou v PDK1. Tento flexibilní ethylový linker byl uzamknut do pětičlenného kruhu, což dramaticky zlepšilo účinnost a selektivitu u látky **17** (IC₅₀ = 2 nM; Obr. 27). Substitucí pozice 4 na terminálním arylovém kruhu fluorem a zavedením heteroatomu do cyklopentylu došlo ke zvýšení selektivity a snížení lipofility této látky (látka **20**: IC₅₀ = 0,6 nM; Obr. 27). Dalšími optimalizacemi byla připravena látka **25** (Obr. 27), což je silný selektivní inhibitor PDK1 s účinností na nádorových liniích SKOV3 a A549 (Murphy *et al*, 2011).



Obr. 27: Vývoj látky 25.

6.6. Inhibitory NEK2

Nek kinasy jsou rodina serin/threoninových kinas tvořící 11 členů (Nek1-11). Nejvíce prostudovanou Nek kinasou je Nek2, která se podílí na mitotických procesech. Je lokalizovaná u centrozomů během celé mitózy a reguluje separaci centrozomů a organizaci mikrotubulů. Zvýšené hladiny Nek2 se vyskytují u několika typů rakoviny včetně karcinomů prsu, hepatocelulárních karcinomů a rakoviny tlustého střeva (Wells *et al*, 2017).

Doposud nejúčinnějším Nek2 inhibitorem je látka **MBM55** (Nek2: $IC_{50} = 1$ nM, Obr. 28a) obsahující imidazo[1,2-a]pyridinový kruh (Xi et al, 2017). Nicméně byly vyvinuty i inhibitory, které nesou purinový skelet. 6-alkoxypuriny byly identifikovány jako ATP-kompetitivní inhibitory Nek2 a CDK2 (látka 6: CDK2 IC₅₀ = 5 nM, Nek2 IC₅₀ = 12 µM; Obr. 28b). Porovnáváním struktur inhibitorů CDK se ukázalo, že modifikace 6alkoxy a 2-arylamino substituentů by mohly zvýšit selektivitu pro Nek2. Bylo zjištěno, že puriny nesoucí meta nebo para substituent na 2-arylamino skupině zvyšuje selektivitu pro Nek2 (viz. látka 7, Nek2: $IC_{50} = 0.89 \mu M$, CDK2: $IC_{50} = 5.6 \mu M$). Jako výchozí bod pro pochopení vazebného módu arylaminopurinů do Nek2 byla použita látka 8 v komplexu s Nek2 (Obr. 28b). Bylo zjištěno, že tato látka vytváří tři vodíkové vazby tvořené dusíky pocházející z purinu, a proto jejich modifikace či odstranění by bylo nežádoucí vhledem k aktivitě těchto látek. Proto se místem pro modifikace stal 6-alkoxy substituent a 6-cyklomethylhexylová skupina, která je rozhodující pro CDK2 aktivitu. Byla identifikována látka 11 (Nek2: IC₅₀ = 0,62 μ M, CDK2: IC₅₀ = 7 μ M; Obr. 28b), která byla připravena po mnoha modifikacích obou pozic. Nicméně bylo dosaženo relativně velké selektivity, a proto by se tato látka mohla stát výchozím bodem pro další studie a modifikace (Coxon et al, 2016).

V roce 2010 byla identifikována kinasa Nek4, která je nadměrně exprimována v rakovině plic a tlustého střeva. Byl identifikován purinový isoster, **BAY61-3606** (Obr. 28a), s aktivitou proti Nek1 (IC₅₀ = 159 nM) a Nek4 (IC₅₀ = 25 nM), který byl původně vyvinut jako inhibitor SYK (Yamamoto *et al*, 2003; Lau *et al*, 2012). Tato látka obsahuje dvě potenciální místa pro tvorbu vodíkových vazeb, a to amid nebo dusík v poloze 1 imidazopyrimidinu. Dalším studiem analogů této látky, bylo zjištěno, že právě tento amid v *ortho* poloze je nutný pro aktivitu na Nek1 a Nek4 (Wells *et al*, 2017).

Ve srovnání s nekovalentními inhibitory mají ireverzibilní inhibitory spoustu výhod včetně prodloužené farmakodynamiky, vyšší účinnosti a selektivity. Ireverzibilní inhibice u Nek2 lze dosáhnout cílením inhibitoru na cystein 22, který leží v blízkosti katalytického místa. Jedním z purinových ireverzibilních inhibitorů Nek2 je i látka **NCL-00017509** (IC₅₀ = 56 nM; Obr. 28a; Fang and Zhang, 2016; Carbain *et al*, 2012).



Obr. 28: a) struktura MBM-55, b) schéma znázorňující vývoj dalších inhibitorů Nek2.

6.7. Inhibitory Aurora kinasy

Aurora kinasy jsou serin/threoninové kinasy důležité zejména během mitosy. Účastní se maturace centrosomů, srovnávání chromozomů, jejich segregace a cytokineze. Rodina Aurora kinas u lidí obsahuje tři členy: Aurora A, B a C, které sdílí konzervovanou C-koncovou katalytickou doménu, ale liší se v buněčné lokalizaci, substrátové specifitě a funkci během mitosy. Aurora A i B byly nalezené nadměrně exprimované v širokém spektru lidských nádorů, což naznačuje, že nádorová onemocnění mohou terapeuticky reagovat na inhibitory těchto kinas (Giet et al, 2005). Proto během posledního desetiletí mnoho farmaceutických firem začalo vyvíjet inhibitory těchto kinas, kdy je třeba zmínit purinové isostery jako **danusertib** (Aurora A: $IC_{50} = 13$ nM, Aurora B: $IC_{50} = 79$ nM; Obr. 29a; Carpinelli et al, 2007; Borthakur et al, 2015) a AT9283 (Aurora A: IC₅₀ = 5 nM, Aurora B: IC₅₀ = 0,8 nM; Obr. 29a; Howard et al, 2009; Moreno et al, 2015), které se nachází v klinickém testování. Obecně lze říci, že tyto inhibitory byly zprvu používány k léčbě solidních nádorů (vaječníků, prsu, plic a tlustého střeva), nicméně i přes širokou variabilitu chemických struktur nebylo dosaženo optimální účinnosti na těchto nádorech. Proto došlo ke změně strategie a inhibitory Aurora kinas byly zkoušeny v klinických studiích u hematologických malignit, kde je vyšší homogenita a míra proliferace buněk ve srovnání se solidními nádory. Jako nejlepší se ale jeví použití inhibitoru Aurora kinasy v kombinaci s jiným inhibitorem (například s inhibitorem FLT3; Bavetsias and Linardopoulos, 2015).

Reversin (Obr. 29b) je 2,6-disubstituovaný purin inhibující Auroru A (IC₅₀ = 876 nM) a Auroru B (IC₅₀ = 98,5 nM), který byl původně identifikován jako látka indukující dediferenciaci myších myoblastů do multipotentních progenitor buněk (Chen *et al*, 2004). Bylo zjištěno, že se jedná i o antagonistu lidských adenosinových receptorů A3 (IC₅₀ = 0,66 μ M; Perreira *et al*, 2005) a inhibitor MP1 (IC₅₀ = 6 nM; Santaguida *et al*, 2010). Schopnost reversinu reverzibilně diferencovat některé nádorové buňky (například leukemické) naznačuje jeho možné použití jako protinádorové činidlo. Reversin se váže do aktivního místa podobně jako látka NU6086 v CDK2. Je zajímavé, že způsob vazby 2,6-disubstituovaných purinů je odlišný od 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Orientace purinového kruhu v aktivním místě Aurory B je totiž nekompatibilní s přítomností

jakéhokoliv substituentu v poloze *N9*, neboť by došlo ke střetu s hlavním kinasovým řetězcem v blízkosti Glu171 (D'Alise *et al*, 2008).



Obr. 29: a) struktura danusertibu a AT9283, b) struktura reversinu.

6.8. Inhibitory GSK-3

Zájem o studium GSK3 α a GSK3 β a jejich inhibitory je z důvodu několika netradičních charakteristik: tato kinasa je konstitutivně aktivní, její substráty musí být obvykle fosforylovány jinou kinasou a spíše, než aktivována bývá inhibována, a to jako reakce na dvě hlavní signální dráhy, o kterých je známo, že zasahují do GSK3 (insulinová a Wnt signální dráha). GSK3 je klíčovou kinasou, která přispívá k abnormální fosforylaci proteinu Tau, o kterém se předpokládá, že způsobuje neurofibrilární klubka u Alzheimerovy choroby (Hanger *et al*, 1992; Mandelkow *et al*, 1992). Další zajímavostí je, že GSK3 je inhibována lithiem (Klein and Melton, 1996; Stambolic *et al*, 1996). Lithium je klasický stabilizátor nálady používaný při léčbě bipolárních poruch, takže toto zjištění vedlo k myšlence, že GSK3 může mít centrální roli při bipolárních poruchách a také to otevřelo

bránu pro objev jiných selektivních inhibitorů GSK3. Během posledních dvaceti let se proto GSK3 stala cílem velkého zájmu a vypadá to, že se dotýká téměř všech aspektů buněčné signalizace a podílí se na velkém počtu fyziologických i patofyziologických procesů. V souvislosti s těmito objevy a následným enormním růstem v objevech nových účinků GSK3 bylo vyvinuto mnoho dalších inhibitorů GSK3. Potenciální terapeutické aplikace zahrnují rakovinu, kardiovaskulární onemocnění, diabetes, zánětlivé stavy, neurodegenerativní onemocnění a psychiatrické onemocnění (Beurel *et al*, 2015).

GSK3 má pravděpodobně více předpokládaných substrátů než jakákoliv jiná kinasa (předpokládá se více než 500, bylo již objeveno asi 100). Takto vysoký počet substrátů vyvolává otázku, proč GSK3 fosforyluje tolik proteinů v buňce, když existuje tolik jiných kinas. Ačkoliv tato otázka nebyla ještě uspokojivě zodpovězena, je naznačeno, že GSK3 musí mít takové vlastnosti, které jsou zvláště užitečné a všestranné. Byly identifikovány dvě funkční domény GSK3, doména vázající substrát a kinasová doména. Rozpoznání substrátu je zásadní mechanismus pro regulaci GSK3. Vazebná doména pro substrát poskytuje vazebné místo pro většinu GSK3 substrátů, které musí být primárně aktivovány fosforylací (S/T-X-X-S/T(P). To znamená, že GSK3 nerozpozná substrát. Díky tomu je GSK3 zapojena v mnoha signálních drahách a otázkou je, zda vysoký počet substrátů neomezuje použití GSK3 jako terapeutického cíle vzhledem k tomu, že by se mohlo narušit mnoho buněčných procesů. Proto jsou hledány takové inhibitory, které budou ovlivňovat jen specifické buňky nebo konkrétní signální dráhy (Beurel *et al*, 2015)

Mnoho inhibitorů GSK-3 jsou ve skutečnosti inhibitory nejen GSK-3, ale i CDK (Meijer *et al*, 2004). To může být vysvětleno podobností ATP vazebného místa v obou kinasach (Vulpetti *et al*, 2005). Rozdílem ve struktuře je přítomnost postranního řetězce Leu132 u GSK3 a Phe80 u CDK2/CDK5. Tento rozdíl může být využit pro návrh selektivních inhibitorů GSK-3 (Liao, 2007). Byla identifikována celá řada heterocyklických inhibitorů GSK-3 jak kompetitivních (pyrazolopyyrimidiny (Peat *et al*, 2004), benzimidazoly (Shin *et al*, 2007), imidazopyridiny (Yngve *et al*, 2012), pyraziny (Berg *et al*, 2012) a další), tak nekompetitivních (5-imino-1,2,4-thiadiazoly (Palomo *et al*, 2012).

Ibrahim et al. (2010) připravili knihovnu 8-substituovaných purinů, které vykazují mikromolární aktivitu na GSK-3, ale kupodivu slabou aktivitu na CDK5. Nízká aktivita

na CDK je dána substitucí v pozici 8, která významně snižuje inhibiční CDK aktivitu (Moravec *et al*, 2003). Nejúčinnější látkou je látka **8a** (IC₅₀ = 16 nM; Obr. 30a), která je stabilizována hydrofobními interakcemi mezi aromatickou skupinou v pozici 8 a vazebným místem v GSK-3. Naproti tomu **14d** (Obr. 30a) měla aktivitu sníženou kvůli přítomnosti cyklopropylové skupiny, pro kterou není dostatečný prostor ve vazebném místě (Ibrahim *et al*, 2010). Dalšími inhibitory GSK3 jsou 4,6-disubstituované pyrrolopyrimidiny (látka **TWS119**, IC₅₀ = 30 nM; Obr. 30a; Ding *et al*, 2003).

Dále bylo pomocí high throughput screeningu identifikován pyrazolopyrimidinový derivát **1** jako inhibitor GSK-3. Díky SAR studiím bylo zjištěno, že pro vysokou účinnost je důležitá fenylová skupina na R^3 a přítomnost vodíků na R^1 a R^2 (Peat *et al*, 2004).



Obr. 30: a) struktura látek 8a, 14d a TWS119, b) vývoj pyrazolopyrimidinového derivátu 1.

7. INHIBITORY OSTATNÍCH KINAS

7.1. Inhibitory PI3K

Fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) jsou lipidové kinasy, které hrají ústřední roli při regulaci buněčného cyklu, apoptosy, opravách DNA, stárnutí, angiogenezi, buněčného metabolismu a motility (Cantley, 2002). Jedná se o signální molekuly, které jsou nejznámější zejména pro svou roli v PI3K/AKT/TOR signální dráze (Burris, 2013). PI3K transmitují signály z povrchu buněk do cytoplazmy tvorbou druhých poslů (fosforylované fosfatidylinositoly), kteří aktivují několik efektorů kinasové dráhy včetně BTK, AKT, PKC, NF-κB a JNK/SAPK dráhu. To podporuje přežití a růst normálních buněk. Ačkoliv je aktivita PI3K regulována interními signály v normálních buňkách (PTEN), deregulace signalizace PI3K je spojena s vývojem jedné třetiny lidských rakovin, kdy aberantní aktivita PI3K dráhy podporuje karcinogenezi a angiogenezi nádorů (Akinleye *et al*, 2013).

U lidí byly identifikovány tři skupiny PI3K (I-III) na základě rozdílu v jejich strukturách, substrátové specifitě a přirozenému lipidovému koncovému produktu. PI3K třídy I jsou heterodimery, které se dále dělí na dvě podrodiny, IA a IB. Podrodina IA je nejvíce prostudovanou a často se podílejí na rakovině. Strukturálně se skládají z katalytické (p110) a regulační (p85) podjednotky. Existují tři katalytické isoformy p110 (α , β a δ). Podrodina IB obsahuje katalytický p110 δ a regulační p101. Regulační podjednotka po aktivaci receptoru rekrutuje katalytickou podjednotku na tyrosinové fosforylované proteiny na plasmatické membráně, kde katalytická podjednotka fosforyluje jejich lipidové substráty (Katso *et al*, 2001; Akinleye *et al*, 2013).

Signalizace PI3K je aberantně aktivována nejméně třemi hlavními mechanismy. Jedná se o mutace nebo amplifikace katalytických podjednotek PI3K, inaktivace lipidové fosfatasy PTEN, a receptorové amplifikace nebo mutace (RTK, GPCR; Akinleye *et al*, 2013). PI3K se proto staly vhodným cílem pro léčbu rakoviny. Řada inhibitorů PI3K podléhá klinickému výzkumu včetně pan-PI3K inhibitorům, které inhibují všechny čtyři isoformy třídy I PI3K, stejně jako selektivních inhibitorů (Obr. 31), např. **pictilisib** (GDC-0941; Folkes *et al*, 2008), **copanlisib** (GDC-0032; Liu *et al*, 2013b) a **taselisib** (BAY 80-6946; Ndubaku *et al*, 2013). Je třeba zmínit i **idelalisib** (GS-1101; Obr. 31), vysoce selektivní inhibitor PI3Kδ, který byl jako první inhibitor PI3K schválen FDA proč léčbu

rakoviny, a to konkrétně pro léčbu chronické lymfocytární leukémie, recidivujícího folikulárního B-buněčného non-Hodgkinova lymfomu a relapsovaného malého lymfocytového lymfomu (Herman *et al*, 2010; Miller *et al*, 2015; Massacesi *et al*, 2016).



Obr. 31: Klinicky testované inhibitory PI3K.

Gilbert a kol. (2010) pomocí hight throught screeningu identifikovali některé puriny mající aktivitu proti PI3K α a PI3K δ . Optimalizací těchto purinů byly připraveny silné purinové, ale i pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinové inhibitory PI3K α s dobrou selektivitou pro PI3K δ a mTOR (Gilbert *et al*, 2010). Tyto struktury vycházejí z dřívějších publikací, kde byl identifikován silný inhibitor PI3K, derivát thieno[3,2-*d*]pyrimidinu (IC₅₀ = 2 nM), který je selektivní pro p110 α (Hayakawa *et al*, 2006). Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny vykazují silnou PI3K α inhibici, ale odlišnou selektivitu ve srovnání s puriny. Zatímco purinové analogy mají tendenci vykazovat mírnou účinnost na mTOR, tak pyrazolopyrimidiny jsou inhibitory silnějšími. Pro lepší pochopení rozdílu v selektivitě byl vytvořen model navázané látky **26** v PI3K. Obecně ale platí, že purinové inhibitory vykazují lepší selektivitu proti mTOR v porovnání s odpovídajícími pyrazolopyrimidiny, nicméně dusíky purinového a pyrazolopyrimidinového jádra nejsou zapojeny do přímých interakcí s enzymy, a proto není jasné, čím je dosažena zvýšená selektivita pro puriny (Gilbert *et al*, 2010).

Dále byla připravena látka **GDC-0941** (**pictilisib**, PI3K α : IC₅₀ = 3 nM, PI3K δ : IC₅₀ = 3 nM; Obr. 31), která je již v II. fázi klinického testování. Tato látka se váže velice podobně jak do p110 δ , tak do p110 α , kde kyslíkový atom morfolinu vytváří vodíkovou vazbu s pantovou oblastí (Obr. 32; Folkes *et al*, 2008). Dále byl popsán selektivní

benzimidazol **2** (Obr. 32), který se stal slibným kandidátem pro další optimalizace (zlepšení selektivity vůči isoformám PI3K a farmakokinetických vlastností *in vitro* a *in vivo*) (Safina *et al*, 2012). Murray el al. (2012) identifikovali řadu dalších silných a selektivních purinových inhibitorů PI3K δ (látka **14**: IC₅₀ = 6 nM; látka **20**: IC₅₀ = 2 nM; Obr. 32; Murray *et al*, 2012). Jejich společným strukturním motivem je substituce v polohách 2, 6, 8 a 9.



Obr. 32: Vývoj PI3K inhibitorů.



Obr. 33: a) vývoj GNE-293, b) schéma vývoje GDC-0084.

Mezi další selektivní inhibitory PI3K δ patří inhibitor **2** (Obr. 33a), který se stal výchozí látkou pro další modifikace. Tyto modifikace se týkají zejména dvou oblastí, a to methylenové oblasti a 2-benzimidazolové oblasti. Různé linkery obsahující různé heteroatomy byly testovány pro jejich účinnost a selektivitu. Výsledkem byla látka **GNE-293** (PI3K δ : IC₅₀ = 0,47 nM; Obr. 33a), obsahující kyslík jako linker, vykazující excelentní isoformovou selektivitu (Safina *et al*, 2013).

Inhibice signalizace PI3K je atraktivní přístup k léčbě nádorů mozku zejména glioblastomům. Aberantní signalizace PI3K je spojena s 80 % případů GM. Aby mohly být inhibitory PI3K využity pro tuto léčbu, je potřeba, aby inhibitor mohl volně procházet hematoencefalickou bariérou. Byly identifikovány molekuly (2, Obr. 33b), které volně procházejí touto bariérou, nicméně nemohly být vybrány pro klinické testování z důvodu špatné clearance u lidí. Dalším studiem byly identifikovány slibné molekuly, které vykazovaly dobrou metabolickou stabilitu. Například látka 4 (Obr. 33b) vykazovala výbornou metabolickou stabilitu, nicméně hodnoty efluxu naznačovaly, že tato látka nebude schopna volně penetrovat přes hematoencefalickou bariéru. Avšak odstraněním dvou donorových vazeb alkoholu v látce 4 by se mohl redukovat eflux. Proto byl raději než

alkylací alkoholu zkoumán účinek uzavření kruhu. Byla proto připravena látka **GDC-0084** (Obr. 33c), která má výbornou buněčnou účinnost, ale i metabolickou stabilitu. Jedná se o silný purinový inhibitor PI3K a mTOR, který je schopný penetrovat přes hematoencefalickou bariéru. Díky tomu je tato látka snad vhodným kandidátem do dalších klinických studií (Heffron *et al*, 2016).

8. METODY

8.1. Syntetické metody

8.1.1. Příprava aminů pro sérii FLT3 inhibitorů

4-fluor-nitrobenzen nebo 5-brom-2-nitropyridin (1 mmol), příslušný sekundární amin (1,05 mmol) a uhličitan draselný (2 mmol) v ethanolu (10 ml) byly v tlakové ampuli zahřívány při teplotě 100 °C po dobu 4 hodin pod argonovou atmosférou. Skončení reakce bylo kontrolováno pomocí TLC (chloroform:methanol, 19:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena rotační vakuovou odparkou (RVO) a odparek byl extrahován suspenzí dichlormethanu (25 ml) ve vodě (25 ml). Vodná fáze byla dvakrát extrahována dichlormethanem (25 ml) a spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou a vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncentrovány na RVO. Surový produkt byl použit pro následující reakce bez dalšího čištění.

Surový produkt (0,75 mmol) z předchozího kroku byl hydrogenován za atmosférického tlaku v methanolu (50 ml) za použití 5 % (w/v) paládia na aktivním uhlí (50 mg). Po spotřebování vodíku byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu, promyta methanolem a odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn ve 2 M kyselině chlorovodíkové (50 ml) a extrahován dichlormethanem (25 ml). Vodná fáze byla neutralizována 5% hydrogenuhličitanem sodným a sraženina byla odfiltrována a promyta vodou. Surový produkt byl vysušen v sušárně.

8.1.2. Příprava N9-substituovaných derivátů purinu

2,6-dichlor-9*H*-purin (15,8 mmol), příslušný alkohol (31,7 mmol) a trifenylfosfin (19,0 mmol) byly rozpuštěny v suchém tetrahydrofuranu a směs byla ochlazena na 0 °C. Za stálého míchání byl pod argonovou atmosférou přidán diisopropylazodikarboxylát (36 mmol) a teplota byla udržována mezi 0-20 °C. Reakční směs byla míchána po dobu 2-4 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (petrolether:ethylacetát, 2:1). Reakční směs byla poté odpařena na RVO a odparek byl rozpuštěn ve vroucím toluenu (100 ml). Po ochlazení na pokojovou teplotu byl roztok inokulován malým množstvím trifenylfosfinoxidu a roztok byl poté ochlazen na 4 °C

po dobu 24 hod. Poté byl trifenylfosfinoxid zfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl poté přečištěn sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1; Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013).

8.1.3. Substituce na C6

K suspenzi 9-substituovaného-2,6-dichlor-9*H*-purinu (6,25 mmol) ve směsi 40 ml *n*-propanolu a *N*,*N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (6,87 mmol) byl přidán příslušný amin (6,87 mmol). Suspenze byla za míchání zahřívána v tlakové ampuli při 120 °C. Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (petrolether:ethylacetát, 2:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a odparek byl extrahován mezi dichlormethan (50 ml) a vodu (50 ml). Vodná fáze byla dvakrát extrahována dichlormethanem (25 ml) a spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncertovány na RVO. V případě potřeby byl surový produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1; Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013).

8.1.4. Substituce na C2

Látky z předchozí reakce o dostatečné čistotě byly předloženy spolu s *trans*-1,4diaminocyklohexanem (či jiným aminem viz. **příloha III**) v *n*-butanolu do tlakové ampule v případě konvenčního zahřívání nebo do kyvety určené pro mikrovlnou syntézu. Reakční směs byla zahřívána pod argonovou atmosférou při 160 °C po dobu 4-10 hodin nebo při teplotě 140-170 °C po dobu 0,5-1,5 hodiny za použití reaktoru CEM Discovery (**supplementary data přílohy II**). Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (chloroform:methanol, 9:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla přidána voda (50 ml) a výsledná suspenze byla extrahována ethylacetátem (3 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (50 ml), solankou (50 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncentrovány na RVO. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (chloroform:methanol, 9:1; Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013). Všechny experimenty používající mikrovlnné záření byly prováděny v mikrovlnném zařízení CEM-Discovery. Reaktor se používá ve standardní konfiguraci s vlastním softwarem. Reakce byly prováděny ve skleněných vialkách o objemu 10 ml, které byly utěsněné silikonovým/PTFE uzávěrem, který mohl být vystaven maximálnímu tlaku 21 barů a teplotě 250 °C. Teplota byla měřena infračerveným čidlem na vnějším povrchu vialky. Po ukončení reakce byla reakční vialka ochlazena na laboratorní teplotu proudem plynu.

8.2. Analytické metody

Čistota meziproduktů a produktů byla sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA). Použité mobilní fáze jsou uvedeny v přípravě daných látek. Vizualizace TLC byla provedena pod UV lampou (Camag) při vlnové délce λ 254 nm nebo 366 nm. Teploty tání byly změřeny na bodotávku Büchi B-540. Elementární analýza byla prováděna za použití analýzátoru EA1112 CHN (Thermo Finnigan).

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla získána na Jeol 500 ECA spektrometru při frekvenci 500 MHz (¹H) a 126 MHz (¹³C). Látky byly rozpuštěné v DMSO- d_6 nebo CDCl₃. Hodnoty chemického posunu jsou udány v jednotkách ppm. Štěpící konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hertz (Hz) a byly používány následující zkratky: singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t) a multiplet (m).

Chromatografická čistota látek byla stanovena HPLC-DAD-MS. Byl použit separační modul Alliance 2695 (Waters), který byl současně spojen s tandemovým hmotnostním spektrometrem s čtyřjádrovým ortogonálním tandemovým hmotnostním spektrometrem PDA 996 (Waters) a Q-Tof mikro (Waters). Vzorek byl rozpuštěn v methanolu (1 mg/ml) a naředěn 100x krát do počáteční mobilní fáze (objem nastříknutého vzorku – 10 µl). Vzorky byly naneseny na RP kolonu (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm, Symmetry C18, Waters). Kolona byla udržována při 25 °C. Rozpouštědlo A byla 15 mM kyselina mravenčí, kdy pH na hodnotu 4,0 bylo upraveno pomocí hydroxidu amonného. Methanol byl použit jako organický modifikátor (rozpouštědlo B). Při průtokové rychlosti 0,2 ml/min byl použit následující binární gradient: 0 min, 10% B; 0-24 min, lineární

gradient 90% B a po 10 min následovala isokratická eluce s 90% B. Po skončení gradientu byla kolona znovu ekvilibrována na počáteční podmínky po dobu 10 min. Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním (ESI+) ionizačním módu. Detekce snímání kladných iontů probíhala ve full scan módu v rozmezí 50-1000 m/z.

8.3. Biochemické metody

8.3.1. Buněčné linie

Lidské nádorové linie byly získány z American Type Culture Collection nebo z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH a byly kultivovány dle pokynů poskytovatele. Buněčné linie MCF-7, BT474, BJ, K562 byly kultivovány v DMEM médiu s 10 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Buněčné linie HCC827 a EOL-1 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 20 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Buněčné linie MV4-11, MOLM-13, THP-1, U937 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 10 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Buněčné linie MRC-5 byla kultivována v EMEM médiu s 10 % fetálního hovězího séra, 1% NEAA, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Všechnny buněčné linie byly kultivovány při 37 °C za přítomnosti 5 % CO₂. Použité buněčné linie vykazují různé alterace genů tyrosinových kinas (Tab. 1).

Buněčná linie	Buněčný typ	Specifikace
HCC-827	Nemalobuněčný karcinom plic	Aktivační mutace v doméně
		EGFR (delece E746-A750)
BT474	Karcinom prsu	Amplifikace EGFR
MCF-7	Karcinom prsu	-
K562	Chronická myeloidní leukémie	Fúzní gen BCR-ABL
EOL-1	Akutní myeloidní (eosinofilní) leukémie	Fúzní gen FIP1L1-PDGFRA
MV4-11	Akutní myeloidní leukémie	Mutace FLT3-ITD
MOLM-13	Akutní myeloidní leukémie	Mutace FLT3-ITD
Kasumi-1	Akutní myeloblastická leukémie	Chromozomální translokace (8;21)
THP-1	Akutní monocytická leukémie	-
U937	Akutní myeloblastická leukémie	-
MRC-5	Fibroblasty	Nenádorová linie
HUVEC	Vaskulární endotel	Nenádorová linie
BJ neprolif.	Fibroblasty	Nenádorová linie

Tab.1: Přehled použitých buněčných nádorových a nenádorových linií.

8.3.2. Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxicity testovaných látek byly použity metody Calcein AM a MTT test. Buňky byly vysazeny do 96-jamkové mikrotitrační desky v množství 2-10 tisíc buněk na jamku (dle rychlosti proliferace) a po 24 hodinách byly ovlivněny požadovanými koncentracemi látek. Po 72 hodinové inkubaci byl přidán roztok Calceinu AM (výsledná koncentrace 1 µg/ml) a po 1 hod byla změřena fluorescence na destičkovém fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems) při 485/538 nm. V případě MTT testu byl po 72 hodinové inkubaci přidán roztok MTT (výsledná koncentrace 1 mg/ml) a po 4 hodinách byl vzniklý formazan rozpuštěn v DMSO. Poté byla stanovena absorbance při 570 nm pomocí destičkového spektrofotometru Infinite M200 PRO (Tecan). Z naměřených hodnot byly zkonstruovány grafy koncentrační závislosti přežívajících buněk (GraphPad Prism 5.0) a z nich interpolací určeny hodnoty GI₅₀, tedy koncentrace redukující počet viabilních buněk na 50 %.

8.3.3. Test inhibice proteinkinas

Aktivní kinasa CDK2/cyklin E byla produkována v hmyzích buňkách Sf9 pomocí bakulovirálního vektoru a byla purifikována na koloně NiNTA (Qiagen). PDGFRα, FLT3-WT, FLT3-ITD a FLT3-D835 byly zakoupeny od firmy ProQinase. Kinasový inhibiční test byl prováděn v 96-jamkové mikrotitrační desce s kulatým dnem. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a postupným vyřeďováním vodou byla připravena koncentrační řada jednotlivých látek s ředícím faktorem 5 v rozmezí 1 nM – 100 µM. Aktivita kinas byla měřena za použití vhodných substrátů (1 mg/ml AGLT (poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) 6:2:5:1 hydrobromid) pro PDGFRα a 1 mg/ml histonu H1 pro CDK2) v přítomnosti 1 a 15 μM ATP pro PDGFR α a CDK2 (0,05 μ Ci [γ -³³P]ATP) a testovanou látkou v konečném objemu 10 µl v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na-orthovanadát, 1.2 mM DTT, 2.5 μg / 50 μl PEG_{20,000}). Mikrotitrační destička byla umístěna do termostatu, kde byla inkubována při teplotě 30 °C na 30 minut. Poté byla reakce zastavena přidáním 5 µl 3% vodného roztoku kyseliny fosforečné. Z každé jamky bylo přeneseno 5 µl na fosfocelulosový papír P-81(Whatman). Po 5 minutách byl papír promyt 3x roztokem 0,5% kyseliny fosforečné a opláchnut 96% ethanolem. Kvantifikace aktivity ³³P byla provedena pomocí biomolekulárního digitálního analyzátoru FLA-7000 (Fujifilm). Z křivek závislosti fosforylace na koncetraci testovaných látek byly stanoveny hodnoty IC₅₀ pomocí programu GraphPad Prism (verze 5.0).

8.3.4. Analýza buněčného cyklu

Asynchronní buňky byly vysázeny do 96-jamkové desky a po preinkubaci byly ovlivněny testovanými sloučeninami po dobu 24 hodin. Adherentní buňky byly nejprve promyty PBS, trypsinizovány a ošetřeny roztokem inhibitoru trysinu (0,1%). Poté byl přidán 5x barvící roztok (17 mM citrát sodný, 0,5% IGEPAL® CA-630, 7,5 mM tetrahydrochlorid sperminu, 2,5 mM Tris, pH 7,6 obsahující 50 µg/ml propidium jodidu). Leukemické buňky byly barveny přímo pomocí 5x barvícího roztoku (tzn. bez trypsinizace). Obsah DNA buněk byl analyzován pomocí průtokové cytometrie za použití 488 nm laseru (BS FACS Verse se softwarem BD FAcSuite TM, verze 1.0.6). Distribuce buněčného cyklu byla analyzována za použití ModFit LT (Verity Software House, verze 4.1.7.). Pro korelaci změn buněčného

cyklu s dalšími parametry byl vypočten poměr G1/G2-M pro každou buněčnou linii a látku (při koncentraci odpovídající hodnotě GI₅₀) a vydělen poměrem G1/G2-M neovlivněných buněk. Tyto hodnoty byly zaznamenány jako relativní poměry G1/G2-M.

8.3.5. Imunodetekce

Buněčné lyzáty byly připraveny ze sklizených buněk v Laemliho pufru. Proteiny byly separovány na SDS-polyakrylamidových gelech a elektroblotovány na nitrocelulózovou membránu. Po blokování byly membrány přes noc inkubovány se specifickými primárními protilátkami, promyty a poté inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidasou. Poté byla peroxidasová aktivita detekována pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (AP biotech) za použití CCD kamery LAS-4000 (Fujifilm). Protilátky anti-PDGFRα (D1E1E) a anti-fosfo-PDGFRα/β Y849/857 (C43E9), anti-fosfo PDGFRα Y1018, anti-fosfo-PDGFRα Y754 (23B2), anti-STAT3 (79D7), anti-fosfo-STAT3 Y705 (D3A7), anti-ERK1/2, anti-fosfo-ERK1/2 T202/Y204, anti-fosfo-MEK1/2 S217/221 (41G9) a anti-GAPDH byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich a anti-PCNA (klon PC-10) byl poskytnut Dr. B. Vojtěškem. Protilátky anti-FLT3 (8F2), anti-fosfo-FLT3 Y589/591 (30D4), anti-fosfo-FLT3 Y591 (33G6), anti-fosfo-ERK1/2 T202/Y204, anti-STAT5, anti-fosfo-STAT5 Y694, anti-ERK1/2, anti-fosfo-ERK1/2 T202/Y204, anti-fosfo-ERK1/2 T202/Y204, anti-MEK1/2 (D1A5), anti-fosfo-MEK1/2 S217/221 (41G9) byly zakoupeny od firmy Cell signaling.

9. KOMENTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1. Syntéza nových inhibitorů PDGFRa a FLT3



Obr. 34: Vyznačení 2, 6 a 9 pozic na purinu.

Purinový skelet je nejvíce se vyskytujícím heterocyklem obsahující dusík v přírodě (Rosemeyer, 2004). Široké spektrum biologických aktivit, které puriny vykazují, je dán povahou substituentů, které mohou být kombinované na pozicích *N1*, C2, *N3*, C6, *N7*, C8 a *N9*. Díky velké strukturní rozmanitosti se stalo purinové jádro často používanou strukturou léčiv a důležitým základním kamenem pro tvorbu kombinatoriálních knihoven, jak bylo popsáno výše (Legraverend, 2008). Vzhledem k tomu, že se pracoviště Laboratoře růstových regulátorů několik desítek let zabývá přípravou a biologickou aktivitou 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013) a purinovými isostery (Jorda *et al*, 2011), byla syntéza zaměřena právě na tyto tři purinové pozice (Obr. 34).

Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Obr. 35a) vychází z komerčně dostupného 2,6-dichlorpurinu, který byl v prvním kroku alkylován v pozici *N9* prostřednictvím Mitsunobu alkylace (Mitsunobu *et al*, 1965; Lu *et al*, 2007). Další z možností přípravy těchto *N9* substituovaných purinů je použití halogen sloučeniny jako alkylačního činidla, avšak nevýhodou této metody je špatná regioselektivita reakce, kdy vzniká velké množství *N7* isomeru (Imbach *et al*, 1999). Produkty této reakce si proto vyžadují vícenásobné přečištění sloupcovou chromatografií či krystalizacemi. Další nevýhodou této reakce je použití karcinogenních a toxických halogen sloučenin. Z těchto důvodů byla pro tuto reakci preferována Mitsunobu alkylace využívající příslušný alkohol jako alkylační činidlo. Kromě purinu a příslušného alkoholu se této reakce účastní dva reagenty, a to trifenylfosfin

a diisopropyl azodikarboxylát (DIAD). Reakce byla udržována při 20-25 °C a v kombinaci s použitím nižšího ekvivalentu použitého DIAD (1,2 ekv.), trifenylfosfinu (1,2 ekv.) a kratší reakční doby byla omezena tvorba nežádoucího *N7* izomeru (Zatloukal, 2013). Nicméně produkt této reakce musel být přečištěn krystalizací a poté sloupcovou chromatografií ve všech případech.

a)



Obr. 35: a) obecné schéma přípravy 2,6,9-trisubstituovaných purinů, b) příprava některých 4-substituovaných fenylaminů.
Druhým krokem přípravy 2,6,9-trisubstituovaných purinů je nukleofilní substituce v pozici C6 purinu s příslušným anilinem nebo benzylaminem (Obr. 35a; Legraverend *et al*, 1999; Kryštof *et al*, 2002). Většina použitých 4-substituovaných fenylaminů používaných pro tuto reakci byly komerčně dostupné, nicméně některé z těchto látek musely být připraveny dvoustupňovou syntézou vycházející z komerčně dostupného 4-bromnitrobenzenu a 2-brom-5-nitropyridinu (Obr. 35a). Nukleofilní substituce v C6 byla prováděna v *n*-propanolu za použití *N*, *N*-diisopropylethylaminu jako báze. Reakční teplota byla udržována v rozmezí 100-120 °C po dobu 3-6 hodin v závislosti na reaktivitě anilinu nebo benzylaminu. Surové produkty byly čištěny krystalizací nebo sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1).

Finálním krokem syntézy byla nukleofilní substituce v poloze C2 purinu s velkým přebytkem *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (v případě látek **4a-4w**) či příslušných aminů (v případě látek **6a-80**; Obr. 35b). Tato reakce probíhala při 160 °C po dobu 4-20 h v olejové lázni v tlakové ampuli. Reakce byla prováděna standardně v olejové lázni, nicméně látky **4a-4w** (příloha II) byly syntetizovány zejména za použití mikrovlnného záření (**supplementary data přílohy II**). Jedná se o alternativní způsob zahřívání reakčních směsí, který může řešit problém s nehomogenním zahříváním u konvenčních technik. Mikrovlnné záření zvyšuje reakční kinetiku, rychlý počáteční ohřev a tím i lepší reakční rychlost, která ústí v čistší reakční produkty a vyšší výtěžky reakcí (Austin *et al*, 2002). V rámci této práce bylo potvrzeno, že mikrovlnné záření pomohlo radikálně snížit reakční čas, a to v některých případech až na třetinu z celkové doby. Finální látky, včetně všech intermediátů, byly identifikovány pomocí námi dostupných analytických metod (¹H NMR, ¹³C NMR, HPLC-MS, elementární analýza, bod tání; více uvedeno v **supplementary data přílohy II** a **II**).

9.2. Vztahy mezi strukturou připravených látek a inhibicí PDGFRa

Trisubstituované puriny byly popsány i jako inhibitory tyrosinových kinas, zejména Src (viz. kapitola 5.2.1.) a Abl (viz. kapitola 5.2.2.). Strukturně se jedná zejména o 6-anilinopuriny vykazující nanomolární inhibici uvedených kinas (O'Hare *et al*, 2004; Shakespeare *et al*, 2008). Systematické studie popisující účinky na receptorové TK však chybí, existuje pouze zmínka o inhibici FLT3 v patentech (Cheng *et al*, 2005). Z tohoto důvodu byla naše pozornost zaměřena na skupinu receptorových TK, a to konkrétně na FLT3 (jejíž funkce a inhibitory jsou popsány v kapitole 5.1.1.) a jí příbuznou PDGFRa (Platelet-derived growth factor receptors α ; **příloha II**).

PDGFR patří do rodiny RTK tzv. III typu, která zahrnuje také c-KIT, c-FMS a FLT3 (Demoulin and Essaghir, 2014). PDGFRα reguluje proliferaci, diferenciaci, adhezi a přežití a je známým protoonkogenem. Konstitutivně aktivní onkogenní forma PDGFRα vzniká následkem mutací, reciprokých translokací a delecí. Takovéto chromozomální přeskupení vytváří fúzní geny, které kódují chimérické onkoproteiny obsahující N-terminální část z intracelulárního proteinu, který je fúzovaný na cytosolickou doménu PDGFR. Bylo nalezeno více než dvacet různých fúzí, kdy mezi nejčastější patří fúze mezi ETV6 a PDGFRB a FIP1L1 a PDGFRA. Fúzní gen *FIP1L-PDGFRA* se vyskytuje u řady eosinofilních onemocnění např. u chronické eosinofilní leukémie (Havelange and Demoulin, 2013). Navzdory významnému pokroku v léčbě těchto onemocnění se závažným problémem stává resistence na léčiva (imatinib, sorafenib, ponatib; Lierman *et al*, 2009). Proto je hledání nových inhibitorů PDGFRα stálé aktuálním tématem.



Obr. 36: Struktura elotinibu, gefitinibu a lapatinibu s vyznačeným 6-fenylaminopyrimidinovým motivem.

Připravené látky byly navrženy na základě předchozích zkušeností a znalostí z literatury, kdy byly modifikovány zejména substituenty v poloze *N9* purinu za účelem snížit aktivitu vůči CDK2 a přitom neomezit aktivitu proti PDGFRα. Do pozice C6 byla navržena fenylaminová skupina, kdy tento 6-fenylaminopyrimidinový motiv je přítomný taktéž v několika inhibitorech EGFR (např. erlotinib, gefitinib, lapatinib aj.), což potvrzuje hypotézu, že substituované puriny mohou být inhibitory i těchto kinas (Obr. 36).

Látky 4a-4w, které byly připravené jako potenciální inhibitory PDGFRα, byly podrobeny charakterizaci jejich biologických účinků (příloha II). Byla studována inhibice CDK2 a PDGFRa všech finálních produktů, a cytotoxicita na pěti buněčných liniích s různou expresí onkogenních TK, vliv na buněčný cyklu a na buněčnou signalizaci řízenou PDGFRα (Obr. 37). Na základě výsledků bylo zjištěno, že výskyt fenylaminové skupiny v poloze C6 je esenciální pro inhibici PDGFR α (IC₅₀<0,1 μ M). Přítomnost této skupiny měla za následek významné zesílení účinku na PDGFRa v porovnání s látkami obsahující benzylový kruh (4a a 4b). Na druhou stranu záměna anilinu za benzyl nikterak neovlivňovala inhibici CDK2, což koresponduje s již dříve popsanými 2,6,9-trisubstituovanými puriny (Gray et al, 1998). Jako příklad lze porovnat látku 4u s 4b nebo látku 4q s 4a. Substituce těchto kruhů chlorem, hydroxy nebo methoxy skupinou taktéž zásadně neovlivňovala účinnost látek. Naproti tomu dimethoxyderiváty obvykle aktivitu snižovaly, kdy látky 4h, 4f a 4g vykazovaly pouze mikromolární inhibici na PDGFR α . Navíc srovnání látek **4f** a **4l** naznačuje, že 3,5-dimethoxy je více preferován než 2,4-konfigurace.

	CDK2	PDGFRa	EOL1	K562	HCC827	BT474	MCF7	EOL-1 G1/G2	HCC827 G1/G2	K562 G1/G2
CDK2					*			*	*	
PDGFRa	0.52		**					**		
EOL1	0.46	0.76								
K562	0.15	0.13	-0.09		**	**	**			
HCC827	0.55	0.28	0.18	0.73		**	**			
BT474	0.21	0.09	0.05	0.72	0.71		**			
MCF7	0.46	0.13	0.14	0.67	0.79	0.72				
EOL-1 G1/G2	-0.58	-0.73	-0.39	-0.20	-0.43	-0.17	-0.13			
HCC827 G1/G2	0.56	0.18	0.45	0.11	0.29	0.26	0.49	-0.13		
K562 G1/G2	0.15	0.39	0.12	0.03	-0.01	-0.04	0	-0.16	-0.16	

Obr. 37: Pearsonovy korelace pro naměřené parametry. Hvězdičky označují statistickou významnost (*P <0.01, ** P<0.001).

Nicméně nejpodstatnější strukturní změnou u této série byla volba jiných substituentů v poloze *N*9 za účelem snížení aktivity vůči CDK2, a přitom zachovat nebo zvýšit aktivitu proti PDGFR α . Známé purinové inhibitory CDK2 obsahují v této pozici obvykle isopropyl či cyklopentyl, který přispívá nemalou měrou k interakci s malou hydrofobní kapsou v CDK2 (De Azevedo *et al*, 1997). U série látek **4a-4w** došlo k nahrazení jmenovaných substituentů za objemnější alkylové rozvětvené či nerozvětvené řetězce. Nejaktivnější sloučeniny obsahovaly butylový řetězec. Ostatní řetězce, počínaje isopentylem, objemným benzylem (**4c** a **4d**) nebo dlouhým geranylovým řetězcem u **4e**, viditelně zhoršily aktivitu na CDK2. V případě aktivity vůči PDGFR α bylo zjištěno, že nejúčinnější inhibitory obsahují 4-5 uhlíkaté lineární nebo rozvětvené řetězce, jelikož benzylové deriváty (**4c** a **4d**) spolu s geranylovým derivátem (**4e**) patřily mezi nejslabší látky s hodnotami IC₅₀ vyššími než 1 μ M.

U všech nově připravených látek byla studována jejich antiproliferační aktivita na souboru pěti buněčných liniích s různou expresí onkogenních tyrosinových kinas (HCC827, BT474, MCF7, K562, EOL1). Připravené látky vykazovaly aktivitu na všech těchto liniích, avšak míra jejích účinnosti byla zcela odlišná. Slabě reagovaly linie nemalobuněčného karcinomu plic HCC827 a buněčná linie karcinomu prsu BT474 s hodnotami GI₅₀ v rozmezí střední mikromolární koncentrace. Obě tyto linie jsou známé pro jejich aktivační mutace v EGFR. Další buněčná linie karcinomu prsu MCF-7 reagovala silněji, přestože nemá žádnou známou alteraci v tyrosinových kinasách. Podobně citlivá byla i leukemická buněčná linie K562, která exprimuje fúzní kinasu BCR-ABL. Připravené látky vykazovaly mikromolární hodnoty GI₅₀ jak u MCF-7, tak u K562. Avšak nejcitlivější buněčnou linií byla linie eosinofilní leukemie EOL-1. Tato linie exprimuje *FIP1L1-PDGFRA* fúzi (Cools *et al*, 2004) a je velmi citlivá k inhibitorům PDGFRα. Většina námi připravených sloučenin vykazovala výrazně vyšší aktivitu (submikromolární až středně nanomolární hodnoty GI₅₀), což by mohlo naznačovat, že mechanismus účinku v těchto buňkách může být odlišný. Navíc jsme zjistili, že cytotoxicita sloučenin v EOL-1 silně koreluje s inhibicí PDGFRα. Domnívali jsme se, že silná inhibice PDGFRAα a zároveň cytotoxicita na EOL-1 by mohla znamenat souvislost s expresí fúzního genu *FIP1L1-PDGFRA* v této linii. Výsledky dalších experimentů, které ukazují souvislost mezi inhibicí PDGFRα a účinky v linii EOL-1 jsou popsány v kapitole 9.4.

9.3. Vztahy mezi strukturou připravených látek a inhibicí FLT3

Vzhledem k tomu, že PDGFRα patří spolu s FLT3 (viz. **Kapitola 5.1.1**) do stejné rodiny RTK, mohou některé inhibitory inhibovat více členů této rodiny. Jako příklad lze uvést **crenolanib** (**CP-868,596**), který byl vyvinut jako selektivní a účinný inhibitor PDGFR α i β, nicméně vykazuje i vysokou afinitu k FLT3 (Zimmerman *et al*, 2013). Proto byly látky **4a-4w** podrobeny testování inhibice této receptorové kinasy (není publikováno). Antiproliferační účinky připravených látek byly testovány na buněčné linii MV4-11, která exprimuje FLT3-ITD mutaci, a proto je často využívaným *in vitro* modelem pro testování potenciálních inhibitorů FLT3 (Quentmeier *et al*, 2003). Z výsledků vyplývá, že všechny látky **4a-4w** vykazují cytotoxicitu s hodnotami GI₅₀ v rozmezí 3,98 μM – 0,144 μM. V porovnání s antiproliferační aktivitou na EOL-1 mají látky velmi analogický trend i v případě MV4-11, což může být dáno strukturní podobností těchto dvou kinas.

Další strukturní modifikací 2,6,9-trisubstituovaných purinů, která byla studována v rámci této práce, byla extenze substituentu v poloze N^6 , a to se zachovanou substitucí v polohách C2 a N9 kompatibilní s inhibicí CDK2. Tato modifikace výrazně a překvapivě změnila profil cytotoxické aktivity připravených látek. Schopnost inhibovat CDK sice zůstala zachována, ale přitom se významně omezila cytotoxicita vůči naprosté většině

nádorových buněčných linií. Vysoká cytotoxická účinnost zůstala zachována pouze vůči linii MV4-11, odvozené od akutní myeloidní leukemie, která exprimuje onkogenní variantu FLT3-ITD. Další skupinou látek byly látky 6a-80, které byly připraveny jako potenciální inhibitory FLT3 (příloha III, viz. Kapitola 5.1.1.). Tyto látky lze rozdělit do dvou základních skupin dle struktury, a to na 6-(4-substitutované anilino)puriny (6a-6o, 7a-7f, 8a-80) a 6-(5-substituované-3- aminopyridin)puriny (8l, 8m). Jako výchozí struktury pro studium vztahu mezi strukturou a aktivitou byly použity látky 6c a 6d. Do pozice N9 byly zvoleny substituenty jako isopropyl, tetrahydropyran-2-yl, benzyl a cyklopentyl. Nejnižší hodnoty GI₅₀ na nádorové buněčné linii MV4-11 vykazovaly látky nesoucí isopropyl (6a) a cyklopentyl (6c). Tyto látky také velmi účinně inhibovaly FLT3-ITD, stejně jako CDK2. Na rozdíl od látek z předchozí série (4a-4w) byla u těchto látek modifikována i pozice C2. Aminocyklohexylaminová skupina byla nahrazena několika rozvětvenými alkylaminy, stejně tak i objemnými morfolino skupinami nebo 4-methylpiperazin-1-ylovými skupinami. Nicméně žádný z těchto substituentů nepřekročil antiproliferativní a inhibiční aktivity sloučenin obsahující 4-aminocyklohexylamin v C2 pozici, jelikož všechny naměřené hodnoty IC₅₀ a GI₅₀ byly výrazně vyšší (**Tab. 2** v **příloze III**).

Po zjištění, že nejvhodnějšími substituenty v poloze *N9* je cyklopentyl a v C2 4-aminocyklohexylamin, byla modifikována pozice C6 s fixními substituenty na *N9* a C2. V dřívějších publikacích bylo zjištěno, že rozšířením substituentu v pozici C6 dochází k výraznému zvýšení CDK aktivity (Bettayeb *et al*, 2008; Gucký *et al*, 2013). Proto byl halogen u látky **6c** ve fenylaminovém substituentu nahrazen pyrrolidin-1-yl (**7a**), morpholin-4-yl (**7b**), 4-ethyl-piperazin-1-yl (**7c**), morpholin-4-ylmethyl (**7d**), 2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl (**7e**) nebo *N*-4-benzyl-piperazin-1-yl (**7f**). Všechny tyto látky (**7a-7f**) patřily k velmi aktivním; hodnoty GI₅₀ u MV4-11 se pohybovaly v nanomolárních koncentracích a enzymatické aktivity FLT3-ITD a CDK2 byly silně inhibovány nízkou nanomolární koncentrací.

Bylo připraveno i několik látek (**8l, 8m**), u kterých byl modifikován první aromatický kruh v poloze 6, kdy byl fenylamin nahrazen pyridinaminem. Tato modifikace nicméně nezlepšila biologickou aktivitu těchto látek (látka **8l** vykazovala podobné aktivity jako její fenylaminový derivát **7b**).

Vzhledem k tomu, že nejaktivnější sloučeniny ze série 7a-7f obsahovaly cyklopentyl v poloze N9 a rozšířenou 6-(4-substituovanou fenylaminovou) skupinu, byly tyto látky modifikovány v pozici C2 s těmito fixními substituenty na N9 a C6. Cílem těchto modifikací bylo potvrdit, že 4-aminocyklohexylamino je nejoptimálnějším substituentem pro dosažení nejlepší in vitro aktivity. Aminocyklohexylamino byl proto nahrazen lineárními aminoalkylaminy, hydroxyalkylaminy nebo objemnými nasycenými heterocyklickými skupinami. Sloučeniny nesoucí aminobutylamin (8a, 8n, 8o) v pozici C2 vykazovaly srovnatelnou účinnosti proti FT3-ITD jako látky s aminocyklohexylaminem (7b, 7c, 7d). Nicméně látky 8a, 8n a 8o výrazně snížily inhibici CDK2 (8a vs 7d: 923 nM vs 7 nM). Je možné říci, že čím delší aminoalkylový postranní řetězec byl, tím slabší byly antiproliferační i kinasové inhibiční aktivity. To samé platilo i v případě derivátů s hydroxybutylaminy (8i, 8j, 8k). Zkrácení hydroxyalkylového řetězce taktéž snížilo aktivitu těchto látek (8i- hydroxyelhylamin, 8j-hydroxypropylamin) nejen na FLT3, ale i na CDK2, kdy hodnoty IC₅₀ stouply na mikromolární koncentrace. Podobných aktivit bylo dosaženo u látek nesoucí objemné substituenty jako morfolin (**8f**) nebo methypiperazin (8g) v poloze C2, avšak nejméně účinné sloučeniny obsahovaly piperidin (8h), benzylamin (8d) a 4-methoxybenzylamin (8e).

Nejúčinnější látky byly testovány na panelu devíti buněčných liniích s různým histologickým původem (**tab. 5** v **příloze III**). Látky vykazovaly nanomolární aktivitu na linii MOLM-13 (FLT3-ITD pozitivní linie), nicméně na jiných rakovinných buněčných liniích byly hodnoty GI₅₀ v mikromolárních koncentracích, což potvrdilo vysokou selektivitu látek vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám. Linie jako Kasumi-1 a HCC-827, které nesou aktivační mutaci v c-Kit a aktivační deleci v EGFR, vykazovaly submikromolární citlivost na látky **7a-7e**. Důležité ale je, že netransformované lidské buňky MRC-5, HUVEC a neproliferující buňky BJ, nebyly těmito látkami ovlivněny ani při koncentraci 1 000 krát vyšší než byly koncentrace použité na buňky MV4-11 a MOLM-13.

9.4. Buněčné účinky připravených inhibitorů

Pro látky 4a-4w byly další experimenty navrženy tak, aby potvrdily naši hypotézu, že nejúčinnější látky z této série jsou inhibitory FIP1L1-PDGFRa. Nejprve byl studován efekt několika vybraných látek s různou mírou účinku na buněčný cyklus na liniích EOL-1, HCC827 a K562. Obecně lze říci, že CDK inhibitory způsobují blok v G1 i G2-M fázích buněčného cyklu, zatímco inhibitory receptorů tyrosinových kinas většinou G1 blok. Pro každou látku byly proto změřeny změny buněčného cyklu po 24 hodinovém působení v koncentraci, která odpovídá hodnotám GI₅₀. Výsledky potvrdily, že nejcitlivější linie EOL-1 reagovala na látky G1 blokem (relativní poměry G1/G2-M jsou vyšší než 1) právě na sloučeniny s nejvyšší mírou inhibice PDGFRα. Statistická analýza prokázala, že inhibice PDGFRα silně korelovala s relativními hodnotami G1/G2-M (Pearsonův koeficient = - 0,73; Obr. 37). Naproti tomu linie HCC827 a K562 vykazovaly spíše G2-M blok. Různé účinky na těchto třech liniích tedy naznačují, že mechanismus účinku souvisí s přítomností vhodného (primárního) proteinového cíle, kterým je v linii EOL-1 PDGFRα, zatímco při jeho absenci sloučeniny interagují i s jinými proteinkinasami (pravděpodobně CDK2).

Vliv připravených sloučenin na PDGFR α byl na buněčné úrovni dále posuzován pomocí imunoblotingu proteinů zapojených do příslušné signální dráhy. Bylo vybráno několik látek s různými hodnotami aktivit vůči rekombinantní PDGFR α , které byly aplikovány na buňky EOL-1 ve dvou dávkách po dobu 1 hodinu. Poté byly buňky sklizeny a v lyzátech byly analyzovány proteiny STAT3, ERK1/2 a MEK1/2 a jejich fosfoformy, o kterých je známo, že jsou indukovány při aktivaci PDGFR α . Z výsledků je patrné, že došlo ke změnám hladin fosfoforem u všech tří proteinů (**obr. 4** v **příloze II**). Z kvantitativního hlediska ty změny navíc dobře odpovídaly inhibici PDGFR α . Dvě látky **4t** a **4o** (silné inhibitory PDGFR α) významně inhibovaly fosforylaci STAT3 a ERK1/2 u obou testovaných koncentracích, zatímco méně aktivní látky **4j** a **4p** (slabší inhibitory PDGFR α) snížily množství fosfoproteinů pouze při vyšší koncentraci. Nejméně aktivní látky **4a** a **4b** (neinhibující PDGFR α) tyto fosfoproteiny neovlivnily vůbec. Fosforylace MEK1/2 na serinech 217/221 byla mírně snížena pouze u buněk, které byly ošetřeny nejúčinnějšími látkami (**4t** a **4o**). Tyto výsledky dobře korespondují se schopností látek inhibovat PDGFRα

Pro další potvrzení, že mechanismus účinku je specificky spojen s inhibicí PDGFRa, byl sledován vliv koncentrace látky **4u** na autofosforylaci PDGFRa (tyrosiny 754, 849 a 1018). Uvedená tyrosinová residua jsou za normálních okolností po aktivaci PDGFRa autofosforylovány, ale v případě FIP1L1-PDGFRa jsou konstitutivně fosforylovány nezávisle na přítomnosti cytokinu kvůli přerušené juxtamembránové doméně (Stover *et al*, 2006). Inaktivace dráhy řízené PDGFRa potvrdily také poklesy fosfoforem proteinů STAT3 a ERK1/2. Důsledkem inaktivace této signální dráhy je také již zmíněné zastavení proliferace v G1 fázi buněčného cyklu, které rovněž vykazuje koncentrační závislost (**obr. 5** v **příloze II**). Podobně se chovají známé inhibitory FIP1L1-PDGFRa jako imatinib (Dong *et al*, 2011), sorafenib (Lierman *et al*, 2006) a ponatinib (Jin *et al*, 2014).

Molekulární mechanismus působení připravených inhibitorů FLT3 byl studován v buněčné linii MV4-11. MV4-11 buňky byly ovlivněny kandidátní látkou 7d o různých koncentracích po dobu 1 hodiny. Následné analýzy proteinů, souvisejících se signalizací FLT3, ukázaly, že i koncentrace 1 nM byly dostatečné pro inhibici autofosforylace receptoru FLT3 na třech tyrosinových zbytcích (589, 591 a 842). Navíc tato inhibice potlačila aktivitu několika podřízených proteinů, a to STAT5 (Y694) jakožto substrátu onkogenní varianty FLT3-ITD, a dvě klíčové složky MAPK kaskády (ERK1/2 a MEK1/2), které shodně vykazovaly utlumenou fosforylaci na příslušných aminokyselinách (obr.1 v příloze III). Vzhledem k tomu, že signální dráhy MAPK a STAT jsou regulátory proliferace buněk, jejich inhibice vede dle očekávání k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Látka 7d indukovala masivní zástavu v G1 fázi již při koncentraci 1 nM. Při vyšších koncentracích přibývalo výrazně také apoptotických buněk (obr. 2a v příloze III). Jejich nárůst odpovídal také zjištěné fragmentaci proteinu PARP-1, který je během apoptózy specificky štěpen kaspasami 3 a 7 (Kaufmann et al, 1993). Toto štěpení bylo navíc doprovázeno sníženými hladinami antiapoptotického proteinu Mcl-1 (obr. 2b v příloze III; Kojima et al, 2010; Lin et al, 2014).

10. ZÁVĚR

První část předložené disertační práce byla věnována syntéze nových 2,6,9trisubstituovaných purinů s potenciální aktivitou na PDGFR α a FLT3. Tyto látky byly připraveny na základě předchozích zkušeností a znalostí z literatury, a tak došlo k cíleným modifikacím pozic 2, 6 a 9 purinového skeletu za účelem modulace jejich biologických vlastností a zvýšení jejich selektivity vůči příslušným kinasam. Výsledkem byly dvě série látek, a to inhibitorů PDGFR α (23 látek) a inhibitorů FLT3 (49 látek). Všechny připravené látky, včetně meziproduktů, byly charakterizovány s použitím dostupných analytických metod.

Druhou částí disertační práce bylo studium inhibičních a antiproliferačních vlastností připravených látek. Série PDGFRα inhibitorů vykazovaly nanomolární inhibiční aktivity proti PDGFRα a silnou a selektivní cytotoxicitu na lidské eosinofilní leukemické buněčné linii EOL-1, která exprimuje onkogenní kinasu FIP1L1-PDGFRA. Cytotoxicita látek v EOL-1 silně korelovala s inhibicí PDGFRα. Látky kromě toho vykazovaly inhibici autofosforylace PDGFRα a potlačovaly tak její signální dráhu. Některé sloučeniny ze série FLT3 inhibitorů vykazovaly taktéž nanomolární aktivitu proti buněčným liniím akutní myeloidní leukémie s onkogenní variantou FLT3. Nejúčinnější látka **7d** inhibovala autofosforylaci FLT3 a deaktivovala jeho signální dráhu, což vedlo k zastavení buněčného cyklu a indukci apoptosy u linie MV4-11. Další experimenty potvrdily, že testovaná látka indukovala inhibici FLT3 také v podmínkách *in vivo*.

V rámci této práce bylo prokázáno, že přítomnost 6-fenylaminové skupiny v pozici C6 purinu má pozitivní vliv pro inhibici kinas PDGFRα a FLT3 a zároveň byla zjištěna selektivní cytotoxicita na leukemických liniích EOL-1 a MV4-11. Na základě těchto výsledků je možné tyto látky použít jako strukturní motivy pro návrh nových látek s lepšími biologickými vlastnostmi a s potenciálním terapeutickým využitím.

11. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abbas R, Hsyu P-H (2016). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bosutinib. *Clin Pharmacokinet* **54**: 147–66.
- Abdelaziz A, Vaishampayan U (2017). Cabozantinib for Renal Cell Carcinoma: Current and Future Paradigms. *Curr Treat Options Oncol* **18**: .
- Abdelgawad MA, Bakr RB, Alkhoja OA, Mohamed WR (2016). Design, synthesis and antitumor activity of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as EGFR-TK inhibitors. *Bioorg Chem* **66**: 88–96.
- Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D (2013). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* **6**: 88.
- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. and Walter P (2008). Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochem Mol Biol Educ* 36: 317–318.
- Altmann E, Cowan-Jacob SW, Missbach M (2004). Novel purine nitrile derived inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. *J Med Chem* **47**: 5833–5836.
- Anscombe E, Meschini E, Mora-Vidal R, Martin MP, Staunton D, Geitmann M, et al (2015). Identification and Characterization of an Irreversible Inhibitor of CDK2. Chem Biol 22: 1159– 1164.
- Arteaga C (2003). ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* **284**: 122–130.
- Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 14: 130–146.
- Austin RE, Okonya JF, Bond DRS, Al-Obeidi F (2002). Microwave-assisted solid-phase synthesis (MASS) of 2,6,9-trisubstituted purines. *Tetrahedron Lett* **43**: 6169–6171.
- Azevedo WF De, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH (1997). Inhibition of cyclindependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* **243**: 518–526.
- Bakr RB, Abdelall EKA, Abdel-Hamid MK, Kandeel MM (2012). Design and synthesis of new EGFR- tyrosine kinase inhibitors containing pyrazolo[3,4-d]pyrimidine cores as anticancer agents. *Bull Pharm Sci* **35**: 27–42.
- Balaji K, Vijayaraghavan S, Diao L, Tong P, Fan Y, Carey JP, et al (2016). AXL Inhibition Suppresses the DNA Damage Response and Sensitizes Cells to PARP Inhibition in Multiple Cancers. Mol Cancer Res 45–58doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0157.
- Banks AS, McAllister FE, Camporez JPG, Zushin P-JH, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, *et al* (2014). An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPARγ. *Nature* **517**: 391–395.
- Barilá D, Superti-Furga G (1998). An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet* 18: 280–282.

Barile E, De SK, Pellecchia M (2012). PDK1 inhibitors. Pharm Pat Anal 1: 145-63.

- Barnes PJ (2013). New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Discov* **12**: 543–559.
- Bavetsias V, Linardopoulos S (2015). Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Front* Oncol 5: .
- Beck JP, Arvanitis AG, Curry MA, Rescinito JT, Fitzgerald LW, Gilligan PJ, *et al* (1999). Purin-8ones as corticotropin-releasing hormone (CRH-R1) receptor antagonists. *Bioorganic Med Chem Lett* **9**: 967–972.
- Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger JS, *et al* (2013). Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* 122: 2443–2452.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Crémel G, Hubert P (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**: 23–38.
- Berg S, Bergh M, Hellberg S, Hogdin K, Lo-Alfredsson Y, Soderman P, et al (2012). Discovery of novel potent and highly selective glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) inhibitors for Alzheimer's disease: design, synthesis, and characterization of pyrazines. J Med Chem 55: 9107–9119.
- Bettayeb K, Oumata N, Echalier a, Ferandin Y, Endicott J a, Galons H, *et al* (2008). CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27: 5797–5807.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther* 148: 114–131.
- Bibian M, Rahaim RJ, Choi JY, Noguchi Y, Schürer S, Chen W, *et al* (2013). Development of highly selective casein kinase 1δ/1ε (CK1δ/ε) inhibitors with potent antiproliferative properties. *Bioorganic Med Chem Lett* 23: 4374–4380.
- Blanchard S, Soh CK, Lee CP, Poulsen A, Bonday Z, Goh KL, *et al* (2012). 2-Anilino-4-aryl-8Hpurine derivatives as inhibitors of PDK1. *Bioorganic Med Chem Lett* 22: 2880–2884.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001). Oncogenic kinase signalling. Nature 411: 355-65.
- Borthakur G, Dombret H, Schafhausen P, Brummendorf TH, Boisse N, Jabbour E, *et al* (2015). A phase I study of danusertib (PHA-739358) in adult patients with accelerated or blastic phase chronic myeloid leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant or intolerant to imatinib and/or other second generation c-. *Haematologica* **100**: 898–904.
- Brehme M, Hantschel O, Colinge J, Kaupe I, Planyavsky M, Köcher T, *et al* (2009). Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7414–9.
- Burris HA (2013). Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: Focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**: 829–842.
- Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al (2013). An epithelialmesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and

identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* **19**: 279–290.

Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296: 1655–7.

- Carbain B, Bayliss R, Boxall K, Coxon C, Lebraud H, Matheson C, *et al* (2012). 2-arylamino-6ethynylpurines as potent irreversible inhibitors of the mitotic kinase Nek2. *Eur J Cancer* **48**.
- Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML, Cappella P, Gianellini L, Croci V, *et al* (2007). PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Mol Cancer Ther* **6**: 3158–3168.
- Castillo JJ, Palomba ML, Advani R, Treon SP (2016). Ibrutinib in Waldenström macroglobulinemia: latest evidence and clinical experience. *Ther Adv Hematol* **7**: 179–186.
- Cheng D, Ding Q, Han D, Gray NS, Zhang G (2005). 6-substituted anilino purines as RTK inhibitors. WO2005016528A2.
- Cividini F, Pesi R, Chaloin L, Allegrini S, Camici M, Cros-Perrial E, *et al* (2015). The purine analog fludarabine acts as a cytosolic 5'-nucleotidase II inhibitor. *Biochem Pharmacol* 94: 63–68.
- Clark AS, Karasic TB, DeMichele A, Vaughn DJ, O'Hara M, Perini R, *et al* (2016). Palbociclib (PD0332991)-a Selective and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor: A Review of Pharmacodynamics and Clinical Development. *JAMA Oncol* **2**: 1–8.
- Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB (2014). Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem* **57**: 5023–5038.
- Cohen MH, Moses ML, Pazdur R (2002). Gleevec for the treatment of chronic myelogenous leukemia: US. Food and Drug Administration regulatory mechanisms, accelerated approval, and orphan drug status. *Oncologist* **7**: 390–392.
- Cools J, Quentmeier H, Huntly BJP, Marynen P, Griffin JD, Drexler HG, *et al* (2004). The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFRA-positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* **103**: 2802–2805.
- Coxon CR, Anscombe E, Harnor SJ, Martin MP, Carbain B, Golding BT, et al (2017). Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylaminopurines. J Med Chem 60: 1746–1767.
- Coxon CR, Wong C, Bayliss R, Boxall K, Carr KH, Fry AM, et al (2017). Structure-guided design of purine-based probes for selective Nek2 inhibition. *Oncotarget* **8**: 19089-19124.
- D'Alise AM, Amabile G, Iovino M, Giorgio FP Di, Bartiromo M, Sessa F, *et al* (2008). Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* **7**: 1140–1149.
- Dalgarno D, Stehle T, Narula S, Schelling P, Schravendijk MR van, Adams S, *et al* (2006). Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. *Chem Biol Drug Des* **67**: 46–57.
- Davies TG, Bentley J, Arris CE, Boyle FT, Curtin NJ, Endicott JA, et al (2002). Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. Nat Struct Biol 9: 745–749.

- Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo J V (1997). The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* **90**: 3691–3698.
- Deininger MWN, Goldman JM, Melo J V (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**: 3343–3356.
- Demange L, Abdellah FN, Lozach O, Ferandin Y, Gresh N, Meijer L, et al (2013a). Potent inhibitors of CDK5 derived from roscovitine: Synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 125–131.
- Demange L, Lozach O, Ferandin Y, Hoang NT, Meijer L, Galons H (2013b). Synthesis and evaluation of new potent inhibitors of CK1 and CDK5, two kinases involved in Alzheimer's disease. *Med Chem Res* 22: 3247–3258.
- Demoulin J-B, Essaghir A (2014). PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 1–11.
- Ding S, Wu TYH, Brinker A, Peters EC, Hur W, Gray NS, *et al* (2003). Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7632–7.
- Dong Y, Jia L, Wang X, Tan X, Xu J, Deng Z, *et al* (2011). Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *Int J Oncol* **38**: 555–569.
- Dreyer MK, Borcherding DR, Dumont JA, Peet NP, Tsay JT, Wright PS, *et al* (2001). Crystal structure of human cyclin-dependent kinase 2 in complex with the adenine-derived inhibitor H717. *J Med Chem* **44**: 524–530.
- Ek S, Högerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CAK (2002). Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res* **62**: 4398–4405.
- Eswaran J, Lee WH, Debreczeni JE, Filippakopoulos P, Turnbull A, Fedorov O, *et al* (2007). Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* **15**: 201–213.
- Evans CO, Young AN, Brown MR, Brat DJ, Parks JS, Neish AS, *et al* (2001). Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3097–3107.
- Fang Y, Zhang X (2016). Targeting NEK2 as a promising therapeutic approach for cancer treatment. *Cell Cycle* **15**: 895–907.
- Folkes AJ, Ahmadi K, Alderton WK, Alix S, Baker SJ, Box G, *et al* (2008). The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* 51: 5522–32.
- Gay CM, Balaji K, Byers LA (2017). Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer* **116**: 415–423.

Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ (2009). Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be

or not to be? Nat Immunol 10: 356-360.

- Giet R, Petretti C, Prigent C (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* **15**: 241–250.
- Gilbert AM, Nowak P, Brooijmans N, Bursavich MG, Dehnhardt C, Santos ED, *et al* (2010). Novel purine and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine inhibitors of PI3 kinase-??: Hit to lead studies. *Bioorganic Med Chem Lett* **20**: 636–639.
- Gocek E, Moulas AN, Studzinski GP (2014). Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* **51**: 125–37.
- Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M (2014). Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther* **37**: 317–324.
- Graham DK, Salzberg DB, Kurtzberg J, Sather S, Matsushima GK, Keating AK, *et al* (2006). Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **12**: 2662–2669.
- Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, *et al* (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**: 533–538.
- Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al (2015). Non-small-cell lung cancer. Nat Rev Dis Prim 15009doi:10.1038/nrdp.2015.9.
- Grisafi D, Maestro A, Grumi C, Piazzoni L, Tirone G, Fiore W, et al (2015). Ibrutinib: from bench side to clinical implications. *Med Oncol* **32**: 225.
- Gucký T, Jorda R, Zatloukal M, Bazgier V, Berka K, Řezníčková E, *et al* (2013). A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Med Chem* **56**: 6234–6247.
- Halazy S, Ehrhard A, Danzin C (1991). 9-(Difluorophosphonoalkyl)guanines as a New Class of Multisubstrate Analogue Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. J Am Chem Soc 113: 315–317.
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, *et al* (2007). Novel phosphorylation sites in Tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* **282**: 23645–23654.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**: 58–62.
- Hantschel O (2012). Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes Cancer* **3**: 436–446.
- Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J, et al (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. Cell **112**: 845–857.
- Hantschel O, Rix U, Schmidt U, Bürckstümmer T, Kneidinger M, Schütze G, et al (2007). The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. Proc Natl Acad Sci U S A

104: 13283–13288.

- Hantschel O, Superti-Furga G (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl Tyrosine Kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 33–44.
- Harari D, Yarden Y (2000). Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* **19**: 6102–6114.
- Hardcastle IR, Arris CE, Bentley J, Boyle FT, Chen Y, Curtin NJ, *et al* (2004). N2-substituted O6cyclohexylmethylguanine derivatives: Potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *J Med Chem* **47**: 3710–3722.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003). EGF receptor ligands. EGF Recept Fam 3– 14doi:10.1016/B978-012160281-9/50002-5.
- Harrison C, Vannucchi a. M (2012). Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians. *Ther Adv Hematol* **3**: 341–54.
- Havelange V, Demoulin J-B (2013). Review of current classification, molecular alterations, and tyrosine kinase inhibitor therapies in myeloproliferative disorders with hypereosinophilia. *J* Blood Med **4**: 111–121.
- Havlíček L, Hanuš J, Veselý J, Leclerc S, Meijer L, Shaw G, *et al* (1997). Cytokinin-derived cyclindependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* **40**: 408–412.
- Hayakawa M, Kaizawa H, Moritomo H, Koizumi T, Ohishi T, Okada M, *et al* (2006). Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110α inhibitors. *Bioorganic Med Chem* **14**: 6847–6858.
- Heffron TP, Ndubaku CO, Salphati L, Alicke B, Cheong J, Drobnick J, *et al* (2016). Discovery of Clinical Development Candidate GDC-0084, a Brain Penetrant Inhibitor of PI3K and mTOR. *ACS Med Chem Lett* **7**: 351–356.
- Herman SEM, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, *et al* (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase-δ inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* **116**: 2078–2088.
- Hirota K, Kazaoka K, Niimoto I, Kumihara H, Sajiki H, Isobe Y, *et al* (2002). Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer. *J Med Chem* **45**: 5419–5422.
- Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, *et al* (2009). Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23: 1054–61.
- Hospital M-A, Green AS, Maciel TT, Moura IC, Leung AY, Bouscary D, et al (2017). FLT3 inhibitors: clinical potential in acute myeloid leukemia. Onco Targets Ther **10**: 607–615.
- Howard S, Berdini V, Boulstridge JA, Carr MG, Cross DM, Curry J, *et al* (2009). Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent aurora kinase activity. *J Med Chem* **52**: 379–388.

- Huang H, Ma J, Shi J, Meng L, Jiang H, Ding J, *et al* (2010). Discovery of novel purine derivatives with potent and selective inhibitory activity against c-Src tyrosine kinase. *Bioorg Med Chem* **18**: 4615–4624.
- Hubbard SR (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 464–471.
- Hubbard SR, Miller WT (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 117–123.
- Hubbard SR, Till JH (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **69**: 373–398.
- Chan WW, Wise SC, Kaufman MD, Ahn YM, Ensinger CL, Haack T, *et al* (2011). Conformational Control Inhibition of the BCR-ABL1 Tyrosine Kinase, Including the Gatekeeper T315I Mutant, by the Switch-Control Inhibitor DCC-2036. *Cancer Cell* **19**: 556–568.
- Chang YT, Wignall SM, Rosania GR, Gray NS, Hanson SR, Su AI, *et al* (2001). Synthesis and biological evaluation of myoseverin derivatives: Microtubule assembly inhibitors. *J Med Chem* **44**: 4497–4500.
- Chapman E, Ding S, Schultz PG, Wong CH (2002). A potent and highly selective sulfotransferase inhibitor. *J Am Chem Soc* **124**: 14524–14525.
- Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S (2004). Dedifferentiation of Lineage-Committed Cells by a Small Molecule. *J Am Chem Soc* **126**: 410–411.
- Cheng H, Nair SK, Murray BW, Almaden C, Bailey S, Baxi S, *et al* (2016). Discovery of 1-{(3R,4R)-3-[({5-Chloro-2-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4yl}oxy)methyl]-4-methoxypyrrolidin-1-yl}prop-2-en-1-one (PF-06459988), a Potent, WT Sparing, Irreversible Inhibitor of T790M-Containing EGFR Mutants. *J Med Chem* **59**: 2005– 2024.
- Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, *et al* (2001). A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* **8**: 289–299.
- Ibrahim N, Mouawad L, Legraverend M (2010). Novel 8-arylated purines as inhibitors of glycogen synthase kinase. *Eur J Med Chem* **45**: 3389–3393.
- Imbach P, Capraro HG, Furet P, Mett H, Meyer T, Zimmermann J (1999). 2,6,9-Trisubstituted purines: Optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* **9**: 91–96.
- Ishikawa M, Sonobe M, Nakayama E, Kobayashi M, Kikuchi R, Kitamura J, *et al* (2013). Higher Expression of Receptor Tyrosine Kinase Axl, and Differential Expression of its Ligand, Gas6, Predict Poor Survival in Lung Adenocarcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* **20**: 467–476.
- J Jiang J-J (2014). Advances in the Inhibitors of Janus Kinase. Med Chem (Los Angeles) 4.
- Jin Y, Ding K, Li H, Xue M, Shi X, Wang C, *et al* (2014). Ponatinib efficiently kills imatinibresistant chronic eosinophilic leukemia cells harboring gatekeeper mutant T674I FIP1L1-PDGFRα: roles of Mcl-1 and β-catenin. *Mol Cancer* **13**: 17.

- Jorda R, Havlicek L, McNae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Sturc A, *et al* (2011a). Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem* **54**: 2980–2993.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, *et al* (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **362**: 2260–70.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, Timms J, Waterfield MD (2001). Cellular Function of Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 615–75.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Res* **53**: 3976–3985.
- Ke Y-Y, Singh VK, Coumar MS, Hsu YC, Wang W-C, Song J-S, *et al* (2015). Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. *Sci Rep* **5**: 11702.
- Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DT-M, Shimizu I, Fuster JJ, *et al* (2014). An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med* **20**: 1464–71.
- Kim ES (2016). Erratum to: Olmutinib: First Global Approval (Drugs (2016) 76(11), (1153–1158), 10.1007/s40265-016-0606-z). *Drugs* **76**: 1233.
- Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, Hamaguchi M, Ohno R, Saito H, *et al* (1998). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* **12**: 1333–1337.
- Klein PS, Melton DA (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8455–8459.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M (2005). The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* **17**: 675–689.
- Kojima K, Konopleva M, Tsao T, Andreeff M, Ishida H, Shiotsu Y, *et al* (2010). Selective FLT3 inhibitor FI-700 neutralizes Mcl-1 and enhances p53-mediated apoptosis in AML cells with activating mutations of FLT3 through Mcl-1/Noxa axis. *Leukemia* **24**: 33–43.
- Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J (2015). A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu Rev Biochem* **84**: 739–764.
- Kryštof V, Lenobel R, Havlíček L, Kuzma M, Strnad M (2002). Synthesis and biological activity of Olomoucine II. *Bioorganic Med Chem Lett* **12**: 3283–3286.
- Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ (2006). p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 459–471.
- Kurimoto A, Ogino T, Ichii S, Isobe Y, Tobe M, Ogita H, et al (2004). Synthesis and evaluation of 2-substituted 8-hydroxyadenines as potent interferon inducers with improved oral bioavailabilities. *Bioorganic Med Chem* 12: 1091–1099.

- Larrosa-Garcia M, Baer MR (2017). FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Mol Cancer Ther* **16**: 991–1001.
- Lau KS, Zhang T, Kendall KR, Lauffenburger D, Gray NS, Haigis KM (2012). BAY61-3606 affects the viability of colon cancer cells in a genotype-directed manner. *PLoS One* **7**: .
- Lawhorn BG, Philp J, Zhao Y, Louer C, Hammond M, Cheung M, et al (2015). Identification of Purines and 7-Deazapurines as Potent and Selective Type i Inhibitors of Troponin I-Interacting Kinase (TNNI3K). J Med Chem 58: 7431–7448.
- Lee-Sherick a B, Eisenman KM, Sather S, McGranahan a, Armistead PM, McGary CS, *et al* (2013). Aberrant Mer receptor tyrosine kinase expression contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **32**: 1–10.
- Legraverend M (2008). Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron* **64**: 8585–8603.
- Legraverend M, Ludwig O, Bisagni E, Leclerc S, Meijer L, Giocanti N, *et al* (1999). Synthesis and in vitro evaluation of novel 2,6,9-trisubstituted purines acting as cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **7**: 1281–1293.
- Lelais G, Epple R, Marsilje TH, Long YO, McNeill M, Chen B, *et al* (2016). Discovery of (R,E)-N-(7-chloro-1-(1-[4-(dimethylamino)but-2-enoyl]azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylisonicotinamide (EGF816), a novel, potent, and WT sparing covalent inhibitor of oncogenic (L858R, ex19del) and resistant (T790M) EGFR mutants . *J Med Chem* **59**: 6671–6689.
- Lemmon MA, Schlessinger J (2010a). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117–1134.
- Lemmon MA, Schlessinger J (2010b). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**: 1117–1134.
- Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM (2014). The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**: .
- Levis M (2011). FLT3/ITD AML and the law of unintended consequences. Blood 117: 6987–6990.
- Liao B-C, Lin C-C, Yang JC-H (2015). Second and third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* **27**: 94–101.
- Liao JJ-L (2007). Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J Med Chem* **50**: 409–424.
- Licciulli S, Maksimoska J, Zhou C, Troutman S, Kota S, Liu Q, *et al* (2013). FRAX597, a small molecule inhibitor of the p21-activated kinases, inhibits tumorigenesis of neurofibromatosis type 2 (NF2)-associated schwannomas. *J Biol Chem* **288**: 29105–29114.
- Lierman E, Folens C, Stover EH, Mentens N, Miegroet H Van, Scheers W, *et al* (2006). Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFRalpha and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFRalpha T674I mutant. *Blood* **108**: 1374–6.

Lierman E, Michaux L, Beullens E, Pierre P, Marynen P, Cools J, et al (2009). FIP1L1-

PDGFRalpha D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1-PDGFRalpha T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib. *Leukemia* **23**: 845–851.

- Lim FPL, Dolzhenko A V. (2014). 1,3,5-Triazine-based analogues of purine: From isosteres to privileged scaffolds in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* **85**: 371–390.
- Lin WH, Yeh TK, Jiaang WT, Yen KJ, Chen CH, Huang CT, *et al* (2014). Evaluation of the antitumor effects of BPR1J-340, a potent and selective FLT3 inhibitor, alone or in combination with an HDAC inhibitor, vorinostat, in AML cancer. *PLoS One* **9**: .
- Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008). TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv Cancer Res* **100**: 35–83.
- Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, Sather S, Migdall-Wilson J, Middleton DH, *et al* (2013). Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **32**: 3420–3431.
- Lipinski CA (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* **1**: 337–341.
- Liu J, Yang C, Simpson C, Deryckere D, Deusen A Van, Miley MJ, et al (2012). Discovery of Novel Small Molecule Mer Kinase Inhibitors for the Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. ACS Med Chem Lett 3: 129–134.
- Liu J, Zhang W, Stashko MA, DeRyckere D, Cummings CT, Hunter D, *et al* (2013a). UNC1062, a new and potent Mer inhibitor. *Eur J Med Chem* **65**: 83–93.
- Liu N, Rowley BR, Bull CO, Schneider C, Haegebarth A, Schatz CA, *et al* (2013b). BAY 80-6946 Is a Highly Selective Intravenous PI3K Inhibitor with Potent p110 and p110 Activities in Tumor Cell Lines and Xenograft Models. *Mol Cancer Ther* **12**: 2319–2330.
- Liu Y, Gray NS (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* **2**: 358–364.
- Llauger L, He H, Kim J, Aguirre J, Rosen N, Peters U, *et al* (2005). Evaluation of 8-arylsulfanyl, 8arylsulfoxyl, and 8-arylsulfonyl adenine derivatives as inhibitors of the heat shock protein 90. *J Med Chem* **48**: 2892–2905.
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, *et al* (2004). Discovery of N-(2chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* **47**: 6658–6661.
- Lozneanu L, Pinciroli P, Ciobanu DA, Carcangiu ML, Canevari S, Tomassetti A, *et al* (2016). Computational and Immunohistochemical Analyses Highlight AXL as a Potential Prognostic Marker for Ovarian Cancer Patients. *Anticancer Res* **36**: 4155–4163.
- Lu W, Sengupta S, Petersen JL, Akhmedov NG, Shi X (2007). Mitsunobu coupling of nucleobases and alcohols: An efficient, practical synthesis for novel nonsugar carbon nucleosides. *J Org Chem* **72**: 5012–5015.
- Luo C, Xie P, Marmorstein R (2008). Identification of BRAF inhibitors through in silico screening.

J Med Chem 51: 6121–6127.

- Luz S, Kongsuphol P, Mendes AI, Romeiras F, Sousa M, Schreiber R, *et al* (2011). Contribution of casein kinase 2 and spleen tyrosine kinase to CFTR trafficking and protein kinase A-induced activity. *Mol Cell Biol* **31**: 4392–404.
- Ma L, Clayton JR, Walgren RA, Zhao B, Evans RJ, Smith MC, *et al* (2013). Discovery and characterization of LY2784544, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor of JAK2V617F. *Blood Cancer J* **3**: e109.
- Malínková V, Vylíčil J, Kryštof V (2015). Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 2014). *Expert Opin Ther Pat* **25**: 953–970.
- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Lint J Van, Vandenheede JR, *et al* (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* **314**: 315–321.
- Manning G (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (80-)* **298**: 1912–1934.
- Mapelli M, Massimiliano L, Crovace C, Seeliger MA, Tsai LH, Meijer L, *et al* (2005). Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J Med Chem* **48**: 671–679.
- Mariaule G, Belmont P (2014). Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: Where are we now? A short survey. *Molecules* **19**: 14366–14382.
- Massacesi C, Tomaso E di, Urban P, Germa C, Quadt C, Trandafir L, *et al* (2016). PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: Implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther* **9**: 203–210.
- Medina JR (2013). Selective 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) inhibitors: Dissecting the function and pharmacology of PDK1. *J Med Chem* **56**: 2726–2737.
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P (2004). Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 471–480.
- Melo J V., Deininger MWN (2004). Biology of chronic myelogenous leukemia Signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am* **18**: 545–568.
- Menet CJ, Fletcher SR, Lommen G Van, Geney R, Blanc J, Smits K, *et al* (2014). Triazolopyridines as selective JAK1 inhibitors: From hit identification to GLPG0634. *J Med Chem* **57**: 9323–9342.
- Miller BW, Przepiorka D, Claro RA de, Lee K, Nie L, Simpson N, *et al* (2015). FDA approval: idelalisib monotherapy for the treatment of patients with follicular lymphoma and small lymphocytic lymphoma. *Clin Cancer Res* **21**: 1525–9.
- Mitsunobu O, Obata T, Mukaiyama T (1965). Preparation of Esters of Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *J Org Chem* **30**: 1071–1073.
- Moasser MM (2007). Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene* **26**: 6577–6592.

Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al (2009). Bruton's tyrosine

kinase (Btk): Function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* 228: 58–73.

- Moravec J, Kryštof V, Hanuš J, Havlíček L, Moravcová D, Fuksová K, et al (2003). 2,6,8,9-Tetrasubstituted purines as new CDK1 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* **13**: 2993–2996.
- Moreno L, Marshall L V., Pearson ADJ, Morland B, Elliott M, Campbell-Hewson Q, *et al* (2015). A phase i trial of AT9283 (a selective inhibitor of aurora kinases) in children and adolescents with solid tumors: A cancer research UK study. *Clin Cancer Res* **21**: 267–273.
- Murphy ST, Alton G, Bailey S, Baxi SM, Burke BJ, Chappie TA, *et al* (2011). Discovery of novel, potent, and selective inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase (PDK1). *J Med Chem* **54**: 8490–8500.
- Murray BW, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, *et al* (2010). Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9446–9451.
- Murray JM, Sweeney ZK, Chan BK, Balazs M, Bradley E, Castanedo G, *et al* (2012). Potent and Highly Selective Benzimidazole Inhibitors of PI3-Kinase Delta. *J Med Chem* **55**: 7686–7695.
- Murray PJ (2007). The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunol* **178**: 2623–2629.
- Muth F, Günther M, Bauer SM, Döring E, Fischer S, Maier J, *et al* (2015). Tetra-substituted pyridinylimidazoles as dual inhibitors of p38α mitogen-activated protein kinase and c-jun N-terminal kinase 3 for potential treatment of neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **58**: 443–456.
- Myers SH, Brunton VG, Unciti-Broceta A (2016). AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem* **59**: 3593–3608.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, *et al* (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**: 1911–8.
- Ndubaku CO, Heffron TP, Staben ST, Baumgardner M, Blaquiere N, Bradley E, *et al* (2013). Discovery of 2-{3-[2-(1-isopropyl-3-methyl-1H-1,2-4-triazol-5-yl)-5,6dihydrobenzo[f]imidazo[1,2- d][1,4]oxazepin-9-yl]-1H-pyrazol-1-yl}-2- methylpropanamide (GDC-0032): A??-sparing phosphoinositide 3-kinase inhibitor with high unbound exposure and rob. *J Med Chem* **56**: 4597–4610.
- Noronha G, Cao J, Zeng B, Mak C, McPherson A, Renick J, et al (2007). Thiazole inhibitors targeting resistant kinase mutations. US20070161645A1.
- O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, Keats JA, Abdullah OM, Moseson EM, *et al* (2004). Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML. *Blood* **104**: 2532–2539.
- O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, *et al* (2009). AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell* **16**: 401–412.
- Okram B, Nagle A, Adrián FJ, Lee C, Ren P, Wang X, et al (2006). A General Strategy for Creating "Inactive-Conformation" Abl Inhibitors. Chem Biol 13: 779–786.

- Onken J, Torka R, Korsing S, Radke J, Kremenetskaia I, Nieminen M, *et al* (2016). Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo. *Oncotarget* **7**: 9876–9889.
- Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard ML, *et al* (2008). Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J Med Chem* **51**: 5229–5242.
- Palomo V, Perez DI, Perez C, Morales-Garcia JA, Soteras I, Alonso-Gil S, et al (2012). 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles: First small molecules As substrate competitive inhibitors of glycogen synthase kinase 3. J Med Chem 55: 1645–1661.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 374: 2209– 2221.
- Park H, Choi H, Hong S, Hong S (2011). Identification of novel BRAF kinase inhibitors with structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 5753–6.
- Park H, Jeong Y, Hong S (2012). Structure-based de novo design and biochemical evaluation of novel BRAF kinase inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* **22**: 1027–1030.
- Park SJ, Kim E, Yoo M, Lee JY, Park CH, Hwang JY, Ha JD (2017). Synthesis and biological evaluation of N9-cis-cyclobutylpurine derivatives for use as cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **27**: 4399-4404.
- Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med 366: 1079– 89.
- Paul MK, Mukhopadhyay AK (2004). Tyrosine kinase Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 101–115doi:10.7150/ijms.1.101.
- Pawson T, Gish GD, Nash P (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* **11**: 504–511.
- Peat AJ, Boucheron JA, Dickerson SH, Garrido D, Mills W, Peckham J, et al (2004). Novel pyrazolopyrimidine derivatives as GSK-3 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* 14: 2121–2125.
- Peifer C, Alessi DR (2008). Small-molecule inhibitors of PDK1. ChemMedChem 3: 1810–1838.
- Pendergast AM (2002). The Abl family kinases: Mechanisms of regulation and signaling. Adv Cancer Res 85: 51–100.
- Penning TD, Chandrakumar NS, Desai BN, Djuric SW, Gasiecki AF, Malecha JW, *et al* (2003). Synthesis of imidazopyridines and purines as potent inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. *Bioorganic Med Chem Lett* **13**: 1137–1139.
- Perez DI, Gil C, Martinez A (2011). Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med Res Rev* **31**: 924–954.
- Perreira M, Jiang J-K, Klutz AM, Gao Z-G, Shainberg A, Lu C, *et al* (2005). "Reversine" and its 2substituted adenine derivatives as potent and selective A3 adenosine receptor antagonists. J

Med Chem **48**: 4910–8.

- Peters S, Zimmermann S, Adjei AA (2014). Anti-Tumour Treatment Oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer: Comparative pharmacokinetics and drug–drug interactions. *Cancer Treat Rev* **40**: 917–926.
- Picaud S, Strocchia M, Terracciano S, Lauro G, Mendez J, Daniels DL, *et al* (2015). 9 H -purine scaffold reveals induced-fit pocket plasticity of the brd9 bromodomain. *J Med Chem* **58**: 2718–2736.
- Pissarnitski DA, Asberom T, Boyle CD, Chackalamannil S, Chintala M, Clader JW, *et al* (2004). SAR development of polycyclic guanine derivatives targeted to the discovery of a selective PDE5 inhibitor for treatment of erectile dysfunction. *Bioorganic Med Chem Lett* **14**: 1291–1294.
- Pitts WJ, Vaccaro W, Huynh T, Leftheris K, Roberge JY, Barbosa J, *et al* (2004). Identification of purine inhibitors of phosphodiesterase 7 (PDE7). *Bioorganic Med Chem Lett* **14**: 2955–2958.
- Planken S, Behenna DC, Nair SK, Johnson TO, Nagata A, Almaden C, *et al* (2017). Discovery of N-((3R,4R)-4-Fluoro-1-(6-((3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-9-methyl-9H-purin-2-yl)pyrrolidine-3-yl)acrylamide (PF-06747775) through Structure-Based Drug Design: A High Affinity Irreversible Inhibitor Targeting Oncogenic EGFR Mutants. *J Med Chem* 60: 3002–3019.
- Popowycz F, Fournet G, Schneider C, Bettayeb K, Ferandin Y, Lamigeon C, *et al* (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.
- Poulsen S a, Quinn RJ (1998). Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem* **6**: 619–641.
- Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG (2003). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 17: 120–124.
- Reichert JM, Valge-Archer VE (2007). Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 349–56.
- Robichaud J, Oballa R, Prasit P, Falgueyret J-P, Percival MD, Wesolowski G, *et al* (2003). A novel class of nonpeptidic biaryl inhibitors of human cathepsin K. *J Med Chem* **46**: 3709–27.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**: 5548–5557.
- Rucci N, Susa M, Teti A (2008). Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anticancer Agents Med Chem* **8**: 342–9.
- Rudolph J, Crawford JJ, Hoeflich KP, Wang W (2015). Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs). *J Med Chem* **58**: 111–129.
- Rudolph J, Murray LJ, Ndubaku CO, O'Brien T, Blackwood E, Wang W, *et al* (2016). Chemically Diverse Group i p21-Activated Kinase (PAK) Inhibitors Impart Acute Cardiovascular Toxicity with a Narrow Therapeutic Window. *J Med Chem* **59**: 5520–5541.

Safina BS, Baker S, Baumgardner M, Blaney PM, Chan BK, Chen YH, et al (2012). Discovery of

Novel PI3-Kinase delta Specific Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Taming CYP3A4 Time-Dependent Inhibition. *J Med Chem* **55**: 5887–900.

- Safina BS, Sweeney ZK, Li J, Chan BK, Bisconte A, Carrera D, *et al* (2013). Identification of GNE-293, a potent and selective PI3K?? inhibitor: Navigating in vitro genotoxicity while improving potency and selectivity. *Bioorganic Med Chem Lett* **23**: 4953–4959.
- Saglio G, Kim D-W, Issaragrisil S, Coutre P le, Etienne G, Lobo C, *et al* (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **362**: 2251–2259.
- Santaguida S, Tighe A, D'Alise AM, Taylor SS, Musacchio A (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* **190**: 73–87.
- Shah NP (2004). Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science* (80-) **305**: 399–401.
- Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* **305**: 399-401.
- Shahani VM, Ball DP, Ramos A V., Li Z, Spagnuolo PA, Haftchenary S, *et al* (2013). A 2,6,9hetero-trisubstituted purine inhibitor exhibits potent biological effects against multiple myeloma cells. *Bioorganic Med Chem* **21**: 5618–5628.
- Shahani VM, Yue P, Haftchenary S, Zhao W, Lukkarila JL, Zhang X, *et al* (2011). Identification of purine-scaffold small-molecule inhibitors of stat3 activation by QSAR studies. *ACS Med Chem Lett* **2**: 79–84.
- Shakespeare WC, Wang Y, Bohacek R, Keenan T, Sundaramoorthi R, Metcalf C, *et al* (2008). SAR of carbon-linked, 2-substituted purines: Synthesis and characterization of AP23451 as a novel bone-targeted inhibitor of Src tyrosine kinase with in vivo anti-resorptive activity. *Chem Biol Drug Des* **71**: 97–105.
- Shanware NP, Hutchinson JA, Kim SH, Zhan L, Bowler MJ, Tibbetts RS (2011). Casein kinase 1dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability. *J Biol Chem* **286**: 12766–12774.
- Sharma S, Singh J, Ojha R, Singh H, Kaur M, Bedi PMS, *et al* (2016). Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **112**: 298–346.
- Sharma S V., Bell DW, Settleman J, Haber DA (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7**: 169–181.
- Shawver LK, Slamon D, Ullrich A (2002). Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* **1**: 117–123.
- Shear NH, Spielberg SP, Grant DM, Tang BK, Kalow W (1986). Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity. *Ann Intern Med* **105**: 179–184.
- Shi Q, Tebben A, Dyckman AJ, Li H, Liu C, Lin J, et al (2014). Purine derivatives as potent Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors for autoimmune diseases. Bioorg Med Chem Lett 24: 2206–2211.

- Shin D, Lee S, Heo Y, Lee W, Cho Y, Kim YE, *et al* (2007). Design and synthesis of 7-hydroxy-1H-benzoimidazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 5686–5689.
- Schlegel J, Sambade MJ, Sather S, Moschos SJ, Tan AC, Winges A, *et al* (2013). MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest* **123**: 2257–2267.
- Schlessinger J (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell 103: 211–225.
- Schmidt-Arras D, Bohmer SA, Koch S, Müller JP, Blei L, Cornils H, *et al* (2009). Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood* **113**: 3568–3576.
- Schoumacher M, Burbridge M (2017). Key Roles of AXL and MER Receptor Tyrosine Kinases in Resistance to Multiple Anticancer Therapies. *Curr Oncol Rep* **19**: .
- Schroeder GM, An Y, Cai ZW, Chen XT, Clark C, Cornelius LAM, *et al* (2009). Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4- ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the met kinase superfamily. *J Med Chem* **52**: 1251–1254.
- Schwarz S, Csuk R, Rauter AP (2014). Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Org Biomol Chem* **12**: 2446–56.
- Smith CC, Lin K, Stecula A, Sali A, Shah NP (2015). FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. *Leukemia* 29: 2390–2392.
- Smith KM, Etten RA Van (2001). Activation of c-Abl Kinase Activity and Transformation by a Chemical Inducer of Dimerization. *J Biol Chem* **276**: 24372–24379.
- Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, *et al* (2011). BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* **118**: 1208–1215.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* **6**: 1664–1668.
- Stover EH, Chen J, Folens C, Lee BH, Mentens N, Marynen P, *et al* (2006). Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8078–8083.
- Summy JM, Trevino JG, Lesslie DP, Baker CH, Shakespeare WC, Wang Y, *et al* (2005). AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Mol Cancer Ther.* **4**: 1900-1911.
- Tan CS, Gilligan D, Pacey S (2015). Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* **16**: e447–e459.
- Tripathy D, Bardia A, Sellers WR (2017). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 23: 3251–3262.

Trova MP, Barnes KD, Alicea L, Benanti T, Bielaska M, Bilotta J, et al (2009). Heterobiaryl purine

derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorganic Med Chem Lett* **19**: 6613–6617.

- Verma A, Warner SL, Vankayalapati H, Bearss DJ, Sharma S (2011). Targeting Axl and Mer kinases in cancer. *Mol Cancer Ther* **10**: 1763–1773.
- Vermeire S, Schreiber S, Petryka R, Kuehbacher T, Hebuterne X, Roblin X, *et al* (2017). Clinical remission in patients with moderate-to-severe Crohn's disease treated with filgotinib (the FITZROY study): results from a phase 2, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 389: 266–275.
- Verones V, Flouquet N, Farce A, Carato P, Leonce S, Pfeiffer B, et al (2010). Synthesis, biological evaluation and docking studies of 4-amino-tetrahydroquinazolino[3,2-e]purine derivatives. Eur J Med Chem 45: 5678–5684.
- Veselý J, Havliček L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, et al (1994). Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. Eur J Biochem 224: 771–786.
- Vlahovic G (2003). Activation of Tyrosine Kinases in Cancer. Oncologist 8: 531-538.
- Vulpetti A, Crivori P, Cameron A, Bertrand J, Brasca MG, D'Alessio R, et al (2005). Structurebased approaches to improve selectivity: CDK2-GSK3beta binding site analysis. J Chem Inf Model 45: 1282–90.
- Walton KM, Fisher K, Rubitski D, Marconi M, Meng Q-J, Sládek M, *et al* (2009). Selective inhibition of casein kinase 1 epsilon minimally alters circadian clock period. *J Pharmacol Exp Ther* **330**: 430–9.
- Wang C, Jin H, Wang N, Fan S, Wang Y, Zhang Y, *et al* (2016a). Gas6/Axl axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast cancer through Akt/GSK- $3\beta/\beta$ catenin signaling. *Theranostics* **6**: 1205–1219.
- Wang X, Liu J, Zhang W, Stashko MA, Nichols J, Miley MJ, *et al* (2016b). Design and Synthesis of Novel Macrocyclic Mer Tyrosine Kinase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **7**: 1044–1049.
- Wang X, Saso H, Iwamoto T, Xia W, Gong Y, Pusztai L, *et al* (2013a). TIG1 promotes the development and progression of inflammatory breast cancer through activation of Axl kinase. *Cancer Res* 73: 6516–6525.
- Wang Y, Metcalf CA 3rd, Shakespeare WC, Sundaramoorthi R, Keenan TP, Bohacek RS, et al (2003). Bone-targeted 2,6,9-trisubstituted purines: novel inhibitors of Src tyrosine kinase for the treatment of bone diseases. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 3067–3070.
- Wang Y, Moncayo G, Morin P, Xue G, Grzmil M, Lino MM, *et al* (2013b). Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* **32**: 872–82.
- Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brüggen J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. Cancer Cell 7: 129–141.
- Wells CI, Kapadia NR, Counago RM, Drewry DH (2017). In depth analysis of kinase cross screening data to identify chemical starting points for inhibition of the Nek family of kinases. *bioRxiv* at http://biorxiv.org/content/early/2017/05/14/137968.abstract.

- Westphal M, Meima L, Szonyi E, Lofgren J, Meissner H, Hamel W, *et al* (1997). Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas. *J Neurooncol* **35**: 335–346.
- Wu P, Nielsen TE, Clausen MH (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **36**: 422–439.
- Wu P, Nielsen TE, Clausen MH (2016). Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDAapproved drugs. *Drug Discov Today* **21**: 5–10.
- Xi J-B, Fang Y-F, Frett B, Zhu M-L, Zhu T, Kong Y-N, *et al* (2017). Structure-based design and synthesis of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as novel and potent Nek2 inhibitors with in vitro and in vivo antitumor activities. *Eur J Med Chem* **126**: 1083–1106.
- Xu X, Mao L, Xu W, Tang W, Zhang X, Xi B, *et al* (2016). AC0010, an Irreversible EGFR Inhibitor Selectively Targeting Mutated EGFR and Overcoming T790M-Induced Resistance in Animal Models and Lung Cancer Patients. *Mol Cancer Ther* **15**: 2586–2597.
- Yamamoto N, Takeshita K, Shichijo M, Kokubo T, Sato M, Nakashima K, *et al* (2003). The Orally Available Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor 2-[7-(3,4-Dimethoxyphenyl)-imidazo[1,2c]pyrimidin-5-ylamino]- nicotinamide Dihydrochloride (BAY 61-3606) Blocks Antigen-Induced Airway Inflammation in Rodents. *Pharmacology* **306**: 1174–1181.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, *et al* (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**: 2434–2439.
- Yang J, Wang L, Liu J, Zhong L, Zheng R, Xu Y, et al (2012). Structural optimization and structure-activity relationships of N2-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenyl)-N8-phenyl-9H-purine-2,8-diamine derivatives, a new class of reversible kinase inhibitors targeting both EGFR-activating and resistance mutations. *J Med Chem* **55**: 10685–99.
- Yngve U, Söderman P, Svensson M, Rosqvist S, Arvidsson PI (2012). Imidazopyridine-based inhibitors of glycogen synthase kinase 3: Synthesis and evaluation of amide isostere replacements of the carboxamide scaffold. *Chem Biodivers* **9**: 2442–2452.
- Zacharie B, Fortin D, Wilb N, Bienvenu JF, Asselin M, Grouix B, *et al* (2009). 2,6,9-Trisubstituted purine derivatives as protein A mimetics for the treatment of autoimmune diseases. *Bioorganic Med Chem Lett* **19**: 242–246.
- Zatloukal M, Jorda R, Gucky T, Reznickova E, Voller J, Pospisil T, *et al* (2013). Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **61**: 61–72.
- Zhang J, Yang P, Gray N (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9**: 28–39.
- Zhang W, Deryckere D, Hunter D, Liu J, Stashko MA, Minson KA, *et al* (2014). UNC2025, a potent and orally bioavailable MER/FLT3 dual inhibitor. *J Med Chem* **57**: 7031–7041.
- Zhang W, Zhang D, Stashko MA, DeRyckere D, Hunter D, Kireev D, *et al* (2013). Pseudocyclization through intramolecular hydrogen bond enables discovery of pyridine substituted pyrimidines as new mer kinase inhibitors. *J Med Chem* **56**: 9683–9692.
- Zhou T, Commodore L, Huang WS, Wang Y, Sawyer TK, Shakespeare WC, et al (2010). Structural

analysis of DFG-in and DFG-out dual Src-Abl inhibitors sharing a common vinyl purine template. *Chem Biol Drug Des* **75**: 18–28.

Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J, Hu S, Orwick S, Roberts MS, *et al* (2013). Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood* **122**: 3607–3615.

12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
AAK1	Adapter-associated protein kinase 1
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AML	Acute myeloid leukemia
ARG	Abl-related gene
ATP	Adenosine triphosphate
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BCR	Breakpoint cluster region protein
BLK	B lymphocyte kinase
BRD9	Bromodomain-containing protein 9
BTC	Betacellulin
BTK	Bruton kinase
САМК	Calmodulin/Calcium regulated kinases
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCD	Charge-couple device
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
CDCl ₃	Deuterated chloroform
CDK	Cyklin-dependent kinase
CK1	Casein kinase 1
CML	Chronic myelogenous leukemia
CRH-R1	Corticotropin-releasing hormone receptor 1
DFG	Asp-Phe-Gly
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxide

DTT	Dithiothreitol
DYRK1a	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGN	Epigen
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EOL-1	Human eosinophilic cell line
EPR	Epiregulin
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ETV6	Translocation-Ets-leukemia virus
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FDA	Food and drug administration
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
FNIII	Fibronektin type III domain
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPCR	Receptor spřažený s G proteinem
GSK	Glycogen Synthase Kinase
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCC	Hepatocellular carcinoma
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
Hsp90	Heat shock protein 90
ITD	Internal tandem duplication
ITK	Interleukin-2-inducible T-cell kinase
JAK	Janus kinase
L858R	Leu858Arg mutace
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
mTOR	The mechanistic target of rapamycin

MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NEAA	Non-Essential Amino Acid
NEK2	Serine/threonine-protein kinase Nek2
NMR	Nuclear magnetic resonance
NRTK	Non-receptor tyrosine kinases
p53	Tumor protein p53
РАК	Protein Kinase A
РАК	p21 activated kinases
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDB	Protein data bank
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK1	PI3K 3-fosfoinositin kinasa 1
PEG	Poly(ethylene glycol)
РІЗК	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
РКС	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF	Serin/threonine kinase
RGC	receptor guanylát cyklasy
RHO	Rho family of GTPases
RP	reverse phase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RVO	Rotary evaporator
SH2	Src Homology 2
SH3	Src Homology 3

SDS	Sodium dodecyl sulfate		
SKOV3	Human Caucasian ovary adenocarcinoma		
STAT	Signal transducer and activator of transcription		
T315I	Thr315Ile mutace		
T790M	Thr790Met mutace		
TEC	Tyrosine-protein kinase Tec		
TGF-α	Transforming growth factor alpha		
ТК	Tyrosine kinase		
TKL	Tyrosine kinase-like		
TLC	Thin-layer chromatography		
TNNI3K	TNNI3 interacting kinase		
ТХК	Tyrosine-protein kinase TXK		
ТҮК	Non-receptor tyrosine-protein kinase		
UV	Ultraviolet		
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor		
WT	Wild type		
YES	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes		

13. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno:	Veronika Malínková
Datum narození:	11.8. 1989 v Olomouci
Bydliště:	Příkazy 254, 783 33 Příkazy

Vzdělání:

- 2013 nyní Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta *obor*: Biochemie doktorské studium
- 2011 2013 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta *obor*: Biochemie – magisterské studium
- 2008 2011 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta *obor*: Biochemie – bakalářské studium

Pedagogická činnost:

Cvičení z buněčné biologie (LRR/BUBCV) - zimní semestr

Vybrané kapitoly z organické a analytické chemie (LRR/OACH) - letní semestr

Chemie pro biology 2 (LRR/CHPB2) - letní semestr

Zahraniční stáž:

Univerzita:	De Montfort University, Leicester, Anglie
Fakulta:	Health and Life Sciences
Oddělení:	School of Allied Health Sciences
Vedoucí:	Dr Avninder S Bhambra
Termín konáni:	červenec-říjen 2016
Problematika:	Syntéza racionálně navržených látek s biologickou aktivitou
	(protinádorová, antitrypanosomální)

Seznam publikovaných prací:

Publikované články:

Malínková V, Vylíčil J & Kryštof V (2015) Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25**, 953–970.

Malínková V, Řezníčková E, Jorda R, Gucký T, Kryštof V (2017) Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. doi: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032.

Práce v recenzním řízení:

Gucký T, Řezníčková E, Radošová Muchová T, Jorda R, Klejová Z. **Malínková V**, *et al* (2017) Discovery of N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*.

Konferenční příspěvky:

- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-based development of PAK and MER inhibitors. Konference chemické biologie a genetiky, 2. - 4. března 2014, Kouty nad Desnou, Česká Republika; přednesený příspěvek.
- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-based development of PAK and MER inhibitors. Konference 50th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry "Liblice 2015", 6. - 8. listopadu, Olomouc, Česká Republika; poster.
- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-activity relationships for novel purine inhibitors of PAK4. Konference Growth Regulators on the Way 2016, 3. - 5. března 2016, Malá Morávka, Česká Republika; přednesený příspěvek.
- Malínková V, Řezníčková E, Jorda R, Kryštof V. Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα with high selectivity toward human eosinophilic cell line EOL-1. Konference Chemistry and biology of phytohormones and related substances 2017, 21. - 23. května 2017, Kouty nad Desnou, Česká Republika; přednesený příspěvek.

14. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I:

Malínková V, Vylíčil J & Kryštof V (2015) Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25**, 953–970.

Příloha II:

Malínková V, Řezníčková E, Jorda R, Gucký T, Kryštof V (2017) Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

doi: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032.

Příloha III:

Gucký T, Řezníčková E, Radošová Muchová T, Jorda R, Klejová Z. **Malínková V**, *et al* (2017) Discovery of N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*.
PŘÍLOHA I.

Malínková V., Vylíčil J. & Kryštof V. (2015) Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25**, 953–970.

EXPERT OPINION

- 1. Introduction
- 2. New patent literature on CDKIs
- 3. Conclusions
- 4. Expert opinion

Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 – 2014)

Veronika Malínková, Jakub Vylíčil & Vladimír Kryštof[†]

Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Laboratory of Growth Regulators, Olomouc, Czech Republic

Introduction: Cell cycle deregulation is a common characteristic of cancer cells. Progression through the cell cycle is controlled by enzymes known as cyclin-dependent kinases (CDKs), whose activity can be upregulated by a wide range of molecular mechanisms. Based on these observations, small molecule CDK inhibitors are being developed as potential cancer therapeutics. Some of these compounds have entered Phase III clinical trials and one of them, palbociclib, recently received accelerated approval from the FDA. However, the complexity of CDK biology and the undesired side effects of the existing inhibitors mean that the hunt for new CDK-targeting drug candidates continues.

Areas covered: This article reviews patent applications related to small molecule CDK inhibitors published between 2009 and 2014.

Expert opinion: Clinical trials with pan-specific inhibitors have generally yielded unambiguously positive outcomes. However, better results have been achieved with highly specific inhibitors of CDK4/CDK6. This may be due to several factors and has generated considerable interest in the discovery of new mono-specific CDK inhibitors. The development of such compounds is challenging because all CDKs have very similar active sites. Aside from this issue of selectivity, another key challenge is the identification of patients who will benefit from specific therapies.

Keywords: cancer, CDK, cyclin, inhibitor, kinase

Expert Opin. Ther. Patents (2015) 25(9):953-970

1. Introduction

Cancer is defined as a hyper-proliferative disease mediated by deregulated cell proliferation, reduced differentiation and evaded cell death. These properties are considered druggable and are therefore targeted by a range of anti-cancer therapies that are currently in development. The clinical and economic success of imatinib, the first protein kinase inhibitor approved for treatment of chronic myeloid leukemia, stimulated broad interest in kinases as potential targets for oncological indications and other conditions, especially those for which current therapies offer unsatisfying results [1].

Changes in protein phosphorylation are known to be important in almost all cellular pathways including those that regulate proliferation and the cell cycle. Cyclin-dependent kinases (CDKs, EC 2.7.11.22) are enzymes that play key roles in the control of cell cycle entry (CDK4 and CDK6), DNA replication (CDK2) and the initiation of mitosis (CDK1) [2,3]. CDKs are active throughout the cell cycle until metaphase, when CDK activity is abruptly terminated to allow the completion of mitosis and cytokinesis. This loss of CDK activity is caused by the specific degradation of cyclins, which are regulatory partner proteins that activate CDKs.



Article highlights. Most of the reviewed compounds are ATP competitors. Interest in pan-selective cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors for cancer treatment has declined. There is particular interest in monospecific CDK4/ CDK6/ inhibitors proceeding to the monospecific CDK4/

- CDK6 inhibitors, probably due to the encouraging results of clinical trials with palbociclib.Potent monospecific CDK7 and CDK9 inhibitors have
- Potent monospecific CDK7 and CDK9 inhibitors have been disclosed.
- Selective inhibitors of the less explored CDK3, CDK8 and CDK19 are emerging as possible anticancer drugs.

This box summarizes key points contained in the article.

In addition, some cyclins undergo phase-specific degradation at earlier points in the cell cycle; this is one of the major mechanisms by which cell cycle progression is regulated and coordinated. Other key regulatory processes include the binding of natural CDK inhibitors ([CDKIs] INK4 and Cip/Kip groups), activation of phosphorylation of other CDKs' T-loops by CDK7, and inhibitory phosphorylation by the Wee1 and Myt1 kinases that can be reversed by the cdc25 phosphatases. Some CDKs also have roles beyond the cell cycle in processes such as basal RNA transcription, splicing, the maintenance of neuronal function, apoptosis, motility, stem cell self-renewal and spermatogenesis [4].

Numerous abnormalities related to CDKs have been identified in cancers. Notably, the G1 checkpoint, which is based on CDK4/D-type cyclins together with their substrate RB1 and the CDK4 inhibitor p16^{INK4A}, is non-functional in many tumors. Any change that affects the expression or function of these genes or their products can promote proliferation even in the absence of mitogenic signaling and thereby confer a selective growth advantage. Specifically, uncontrolled proliferation can be promoted by mutation or silencing of the gene encoding p16^{INK4A}, mutation of RB1 or its inactivation at the protein level, deregulation of D-type cyclins or, rarely, amplification of the CDK4 gene. Amplifications of E-type cyclins, which serve as CDK2 activators during the G1/Stransition and S-phase, are also common in certain types of cancer. Finally, some breast malignancies are promoted by shortened hyperactive forms of cyclin E [5]. These molecular changes are very well known and their identification has prompted the development of small molecule CDKIs that block cellular proliferation and induce cell death [6,7]. The first such agents were identified by studying libraries of natural or synthetic compounds; notable examples of the former and latter classes are flavopiridol and roscovitine, respectively (see Figure 1). These inhibitors are generally non-specific and quite weak, having (sub)micromolar potencies. Their biological effects are consistent with the inhibition of one or more of the CDKs that regulate the cell cycle (i.e., CDK1, CDK2, CDK4 and CDK6). Specifically, they reportedly induce phase-specific cell cycle arrest (with the point of arrest depending on the inhibitor's selectivity) and dephosphorylation of known CDK substrates. However, further studies revealed that both flavopiridol and roscovitine are less selective than originally thought, and that they also inhibit CDKs that regulate transcription, that is, CDK7 and CDK9 [8-10]. These two compounds were among the first agents of this class to be evaluated in the clinic and a number of Phase I – II trials were conducted. However, despite their strong and interesting *in vitro* effects in diverse cellular models, they exhibited only marginal anticancer efficacy in patients with solid tumors [10,11]. Slightly better results were obtained in hematological malignancies (chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma).

The gradual increase in understanding of the functions of CDKs in normal and transformed cells was accompanied by the initiation of multiple development programs using both structure- and ligand-based approaches that have yielded a range of second generation CDKIs, as many of which have entered clinical trials (Figure 1). The aim of these programs was to identify new agents with greater selectivity than the first generation compounds and nanomolar potency (Table 1). However, most of the new compounds that progressed into clinical trials are strong inhibitors of multiple CDKs and some also inhibit other unrelated kinases. For example, TG02 inhibits JAK2 and FLT3 in addition to multiple CDKs, whereas PHA-848125 inhibits both CDKs and tropomyosin receptor kinases [12,13]. There are also some agents in clinical trials that inhibit CDKs but are not classified as CDKIs because they primarily target different kinases. Notable examples are the nanomolar CHK1 inhibitor SCH 900776 (MK-8776) [14,15] and terameprocol, which interferes with several unrelated cellular targets [16].

In contrast, the pyridopyrimidine palbociclib and its isosteres ribociclib and abemaciclib are highly selective for CDK4 and CDK6, and induce G_1/S arrest exclusively. These compounds strongly suppress the proliferation of cancer cells expressing wild type RB1 but are much less effective against those lacking functional RB1 [17]. In addition to this straightforward heuristic for identifying patients who would benefit from treatment, palbociclib exhibits reasonable pharmacological properties and has yielded encouraging clinical results. Consequently, in early 2015 it received accelerated approval from the US FDA as a first-in-class compound for the treatment of certain breast cancers [18]. Specifically, palbociclib has been found to act synergistically with hormone therapy in treatment of estrogen receptor (ER)-positive metastatic breast cancers. The rationale for the combination is based on the fact that, at the molecular level, de novo or acquired resistance to estrogen signaling often leads to deregulation of CDK4/ cyclin D, a principal regulator of the G1 checkpoint [19].

On the other hand, pan-selective CDKIs have generally failed in clinical trials. These failures are generally attributed to three factors: their unclear and complicated mechanisms of action, which mainly stem from their interference with several distinct cellular processes; their excessively narrow



Figure 1. Structures of some cyclin-dependent kinase inhibitors evaluated in clinical trials.

therapeutic windows, which reflect the vital roles of CDKs in healthy cells and the lack of robust patient selection criteria [10]. Several studies have shown that the ablation of specific CDKs in cancers bearing genetic mutations in specific oncogenes kills or otherwise prevents the proliferation of transformed cells without harming their untransformed counterparts. Examples of such oncogene/CDK pairings include K-ras/CDK4, MYCN/CDK2 and MYC/CDK1. However, these findings will have to be thoroughly validated in multiple independent models before they can be used as the basis for new therapeutic approaches [20-22]. Because CDKs have functions unrelated to the cell cycle and the deregulation of CDK activity has been implicated in several non-cancer disorders and diseases, small molecule CDKIs have also been tested against models of conditions including inflammatory diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases, stroke, ischemia, viral and unicellular parasite infections and kidney diseases. Patent applications covering newly prepared compounds often claim protection for these uses. However, biological data relating to these diseases are rarely provided and most applications only discuss results relevant to cancer treatment.

Table 1. Selectivit	ty of some CDK	inhibitors	evaluated i	n clinical	trials.
---------------------	----------------	------------	-------------	------------	---------

Compound	IC ₅₀ (nM)						Some other targets		
	CDK1	CDK2	CDK4	CDK5	CDK6	CDK7	CDK9		
Alvocidib (flavopiridol)	30	100	20	170	60	10	10	Egrf, Pak	
Riviciclib (P276-00)	79	224	63		396	2870	20	GSK3-β	
Seliciclib (roscovitine)	330	220		270		800	2300	·	
Dinaciclib (SCH-727965)	3	1		1			4		
R547	0.2	0.4	1	0.1	4	171			
Roniciclib (BAY-1000394)	7	9	11	< 10		25	9		
SNS-032	480	48	> 900	340		62	4	GSK3	
Palbociclib (PD-0332991)	> 10,000	> 10,000	9	> 10,000	15			EGFR, FGFR, PDGFR, IR	
Milciclib (PHA-848125)	2	3	5	4				TRK-A	
Ribociclib (LEE-011)			10		39				
TG02	9	5		4	113	37	3	Lck, TYK2, Fyn, JAK1, JAK2, FLT3, FMS, TYRO3, ERK5	
Abemaciclib (LY-2835219)	1627	504	10	355	5	3910	57	-, -, -, -	
ZK 304709	50	4	61			85	5	VEGER1-3. PDGER-B. Flt-3	
AT-7519	190	44	67	18	170	2400	< 10	GSK3-β	

CDK: Cyclin-dependent kinase

2. New patent literature on CDKIs

Patents were collected from the online databases of the World Intellectual Property Organization (www.wipo.int), European Patent Office (espacenet.com) and American Chemical Society (scifinder.cas.org). Duplicate documents and patents not covering small molecule inhibitors or their applications were removed manually, and the remaining patents were sorted according to the structural similarity of their subject compounds. In some cases, the subject compounds have clear similarities to the existing agents and the patents cover only slightly modified analogs that bind to CDKs in the same manner. More often, the similarity is less obvious but at least some structural motifs are conserved. In total, 12 distinct structural classes of CDKIs were identified, each of which is discussed below.

2.1 Palbociclib and related compounds

The positive clinical results achieved with palbociclib have inspired several research groups to investigate compounds with similar CDK4/CDK6 selectivity. These compounds typically feature variants of palbociclib's heterocyclic skeleton, some of which are tricyclic, together with new substituents.

Novartis and Astex Therapeutics have collaborated to broaden the chemical space around ribociclib and submitted a patent on related compounds that specifically inhibit CDK4 [23]. Over hundred pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives with various side chains attached to the 2-(pyridine-2-yl)amino moiety have been prepared and assayed against CDK1, CDK2 and CDK4. These compounds generally displayed nanomolar IC₅₀ values towards CDK4 (example 1 has an IC₅₀ of < 1 nM) although being at least four orders of magnitude less potent against the other two CDKs that were tested. Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives bearing diverse saturated bicyclic substituents at position 2 have also been patented [24]. This application presents biochemical data for 147 compounds, including IC₅₀ values against CDK4 based on biochemical and cellular assays. In addition, some of the compounds were tested against CDK1 to demonstrate their selectivity. Compound 2 is one of the most potent and selective agents listed, having IC₅₀ values of 3 nM against CDK4 and > 15 μ M for CDK1.

Amgen disclosed compounds structurally related to palbociclib and ribociclib featuring heterocyclic pyrido[4',3':4,5] pyrrolo[2,3-d]pyrimidine cores [25]. This tricyclic system features two important substitution sites that clearly resemble those of previously known CDKIs. The patent application provides CDK4/CDK6 inhibitory constants for an impressive list of 483 agents including compound 3, a single digit nanomolar inhibitor of CDK4 and CDK6.

Two patents from G1 Therapeutics, Inc. describe palbociclib/ribociclib analogs with a pyrimido[5,4-b]indolizine scaffold bearing a spirocyclic fragment [26,27]. The earlier of these two applications discloses the synthesis and basic biochemical characterization of 43 compounds but only provides exact IC₅₀ values for two of them. However, the second cited document reports > 70 compounds that were assayed against CDK4 and CDK2 to determine their potency and selectivity. The most active compounds (e.g., example 4) achieve sub-nanomolar IC50 values against CDK4 although being 1500 - 3000 times less active towards CDK2. The most potent compounds' pharmacokinetic and pharmacodynamic properties were determined in mice; they exhibited 52 - 80% oral bioavailability with plasma half-lifes of 3 - 5 h. Given the role of CDK4 in G1 phase cell cycle arrest, the compounds have been patented as agents for protecting renal tubule epithelial cells against DNA damaging anticancer drugs.

In addition to patents covering novel compounds, several applications have extended the potential clinical applications of known agents, protecting their use in new therapeutic regimes or the treatment of new diseases. As a result, protection has been applied to the use of the CDK4 inhibitor palbociclib together with the MEK inhibitor binimetinib in a new combined therapy for the treatment of solid tumors and hematological malignancies [28]. The patent demonstrates the efficacy of this drug combination against a melanoma *in vitro* and also against melanoma xenografts. In addition, combination therapies featuring both palbociclib [29] and ribociclib [30] together with mTOR inhibitors have been protected.

One tricyclic CDKI developed by Nerviano Medical Sciences, PHA-848125 (Figure 1), is currently being evaluated in clinical trials [31]. Although its structure is somewhat similar to that of palbociclib, it is pan-selective and most potent against CDK2 [13]. Between 2009 and 2014, the company patented its use in the treatment of mesothelioma [32], glioma and glioblastoma [33], and in several combinations with conventional anticancer drugs [34].

In addition, certain crystalline forms of PHA-848125, ribociclib and palbociclib with improved physicochemical properties, have been patented [35-37]. Patent applications covering deuterated forms of ribociclib have also been submitted [38]. Deuterium atoms have been used to label the molecule's *N*,*N*-dimethyl group; the authors suggest that this may increase the compound's metabolic stability and *in vivo* half-life while reducing its dosage requirements. A pharmacokinetic profile and metabolism ratios are presented for one labeled compound to support these claims.

2.2 Flavonoids

Flavopiridol, as one of the first discovered CDKIs, has inspired several analog synthesis campaigns. This approach yielded the new compound P276-00 (Figure 1), which is currently in clinical trials. An optimized large-scale synthetic route to P276-00 that offers superior yields and higher purity than the original synthesis has been developed and protected by two patents [39,40].

In addition, 30 analogs of flavopiridol were prepared and assayed for cytotoxicity in five cancer cell lines; the most potent of these compounds exhibited micromolar IC_{50} values [41]. The three most potent derivatives were tested against individual CDKs and inhibited CDK2 and CDK9 with nanomolar IC_{50} values. The most potent compound (5) was then tested *in vivo* and shown to exhibit anticancer activity in the Ehrlich solid tumor mice model, inhibiting tumor growth by 38% when dosed intraperitoneally at 70 mg/kg.

New compounds isolated from the plant *Rhodiola rosea*, which has various uses in traditional medicine, have been tested as CDK5 inhibitors [42]. The most potent of these species, **6**, exhibited an IC₅₀ of 3.2μ M against CDK5/p25.

2.3 Macrocycles

TG-02, a pyrimidine-based compound in clinical trials, is a potent *in vitro* inhibitor of CDK2, FLT3, JAK2 and JAK V617F with IC₅₀ values in the nanomolar range. To extend its patent protection, novel solid-state forms with improved physiochemical properties have been prepared [43].

In addition, a group of > 40 potent macrocyclic inhibitors of CDK8 has been patented [44]. The most potent example, 7, exhibited an IC_{50} of 24 nM.

2.4 Purines and their isosteres

The purine derivative roscovitine (Figure 1) was one of the first CDKIs to be reported. Its discovery prompted many research groups to explore structurally related compounds with the aim of further optimizing its structure or otherwise exploring nearby chemical space [45]. The first of these approaches has led to the development of many other potent purine CDKIs with improved potency in biochemical and cellular assays. For example, a recent patent described a series of roscovitine derivatives with modified benzyl moieties bearing various combinations of hydroxy, methoxy, methyl and amino functional groups. Activity data for some of these compounds in a mouse xenograft model were also presented [46,47].

The elaboration of the benzyl substituent with an additional aromatic ring yielded a series of roscovitine derivatives with enhanced CDK inhibitory activity as reflected by nanomolar IC₅₀ values towards CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and CDK9 [48]. The disclosed compounds have submicromolar IC₅₀ values in multiple cancer cell lines, including some derived from liver cancers, whereas untransformed hepatocytes were significantly less sensitive. Importantly, no evidence of chemoresistance was observed in cancer cells treated with these compounds for extended periods of time [49,50]. Compound 8 also exhibited in vivo activity in two animal models (standard xenografts and carcinogeninduced spontaneous liver tumors). Significant reductions in tumor number and size were observed even in animals dosed with as little as 1 mg/kg of the compound. In addition, the compounds displayed antiangiogenic activity in tube and scratch migration assays.

In addition to therapeutic agents, fluorescently labeled purines based on roscovitine have been developed for tracking and pharmacodynamics studies. Despite being quite heavily modified (example 9), these compounds retained similar levels of CDK inhibitory activity to those observed for standards including roscovitine [51].

More synthetically challenging modifications of roscovitine's purine core have led to the discovery of several purine bioisosteres (for a review, see [45]). The most advanced agent from this class is dinaciclib (Figure 1), which was developed from a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine scaffold using a screening strategy involving an integrated analysis of both biochemical potency and pharmacological properties [52]. Its inventors



have prepared many other derivatives that are described in several patent applications, one of which describes the preparation of 2-fluoropyrazolo[1,5-a]pyrimidines similar to 10 [53]. However, the patent only describes the synthesis of these compounds and features no biological data.

Experiments using roscovitine derivatives with modified scaffolds bearing nitrogen atoms in different positions led to the identification of the perharidines, compounds based on an imidazo[4,5-b]pyridine core [54-56]. Eight such compounds (including 11) showed activity against several CDKs similar to

that of roscovitine, although their activity towards CDK9 and DYRK1A was somewhat weaker.

Roscovitine analogs with pyrazolo[1,5-a]-1,3,5- triazine cores are also strong CDKIs [57,58]. The most potent such compound was 12, which had IC_{50} values of 19 nM (CDK1), 12 nM (CDK2), 14 nM (CDK5) and 38 nM (CDK9).

Some simpler compounds featuring this core structure were also prepared and assayed as CDKIs, resulting in the identification of new CDK7 inhibitors with IC_{50} values below 10 nM and high selectivity for CDK7 over CDK2 and CDK9 [59]. A notable representative of this class is compound 13, which differs further from roscovitine in that its benzyl moiety bears a methyl group and displays 733-fold selectivity for CDK7 over CDK2 and 598-fold selectivity for CDK7 over CDK9.

The same applicant has identified another subset of CDK7-specific inhibitors based on a pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine scaffold with biaryl side chains [60]. One of the most potent compounds of this class, 14, has an imidazolyl-benzyl side chain; it is $3926 \times$ more active towards CDK7 than CDK2 and $9140 \times$ more active towards CDK7 than CDK9.

2.5 Indoles

The indole ring system has also been used as a scaffold for the development of kinase inhibitors. Interestingly, there are some natural indole-based CDKIs known as the indirubins [61]. An indirubin analog ZK 304709 (Figure 1), which inhibits several receptor tyrosine kinases in addition to various CDKs, has entered Phase I clinical trials [62].

A total of > 15 novel derivatives of indirubin-3'-oxime have been tested as inhibitors of CDK1 and CDK2 and assayed for cytotoxicity in seven cancer cell lines [63]. Notably, the fluorinated derivative 15 displayed nanomolar potency against CDK2 ($IC_{50} = 1.7 \text{ nM}$), > 500-fold selectivity for CDKs over other kinases, and significant *in vivo* anti-cancer activity.

A separate patent described a series of structurally distinct oxindolyl compounds with inhibitory activity against both CDKs and histone deacetylases (HDAC), another important group of anticancer targets [64]. Compound 16 exhibits IC₅₀ values of 64 nM against HDAC and 10 nM against CDK2.

Far simpler 3-alkyl-5,7-dichloro-indoles reportedly inhibit CDK3 at submicromolar concentrations [65]. For example, 17 inhibited CDK3 with an IC₅₀ value of 0.47 μ M but was around 50 times less active towards CDK2 in a biochemical assay. These alkylindoles also preferentially inhibit the growth of various cancer cells in the presence of normal cells, and showed clear in vivo anticancer activity in mice bearing HCT116 xenografts. Moreover, compound 17 exhibited reasonable pharmacokinetics and a complete lack of toxicity under the tested experimental conditions. Until recently CDK3 was considered to be of little interest to medicinal chemists, partly because little was known about its biological functions. However, it clearly has some role in proliferation; in complex with cyclin E, it regulates the transition from the G0 to G1 phases and also stimulates the production of tumor growth factors and angiogenic factors.

The 3-(pyrimidin-4-yl)-indole scaffold has also proven to be suitable for the development of kinase inhibitors [66]. The most potent examples display nanomolar IC₅₀ values against CDK5 (e.g., compound 18 has an IC₅₀ of 1.5 nM) and lower activities against GSK3 β and CK1 ε (high nanomolar IC₅₀ values). Their inhibition of CDK5 in cells was further demonstrated by monitoring the phosphorylation of the Tau protein at Ser396: compound 18 exhibited single-digit micromolar IC_{50} values in an assay based on the depletion of phosphortau in neuroblastoma SY5Y cells dosed for 16 h.

Some multicyclic CDKIs have been reported that feature an indole scaffold fused to another ring system. Compound 19 is claimed to be structurally and functionally similar to the CDK4-inhibiting natural product fascaplysin (20) and proved to be > 50-fold more specific towards CDK4 than CDK2, CDK1 or CDK9 [67]. 19 inhibited the growth of cancer cells at low micromolar concentrations (average $IC_{50} = 0.7 \mu M$). Interestingly, its inhibition of cell growth was independent of the presence or absence of the tumor suppressor proteins p53 and pRB.

2.6 Fused imidazoles

Substituted tricyclic benzimidazoles with several halogen atoms on the scaffold are reported to be potent and selective CDK8 inhibitors with potential applications in the treatment of colorectal cancer and malignant melanoma [68]. In biochemical assays, the most potent of these compounds (21) completely inhibited a recombinant CDK8 at a concentration of 1 μ M but only achieved 55% inhibition of CDK9, 39% inhibition of CDK5, 38% inhibition of CDK1, 21% inhibition of CDK7 and no inhibition of CDK2. Several related compounds displayed very similar profiles, with some showing even higher selectivity towards CDK8. In cancer cell proliferation assays, 21 exhibited (sub)micromolar IC₅₀ values and potentiated oxaliplatin. Compound 6 was also tested *in vivo* and showed strong anticancer activity in a HCT116 xenograft tumor model when dosed at 30 mg/kg.

Certain imidazo[4,5-b]pyridines emerged as potent CDKIs during the optimization of imidazole derivatives [69]. A total of > 80 compounds exhibited IC₅₀ values of < 10 μ M against CDK4, and many were nanomolar inhibitors. Compound 22 was the most potent, with an IC₅₀ of 3 nM.

2.7 Diarylamines

Bayer Pharma published a cluster of patent applications protecting closely related diarylamine derivatives containing various aryl rings as nanomolar CDKIs. The compounds are claimed to be suitable for the treatment of hyperproliferative disorders, virally induced infectious diseases and cardiovascular diseases. Two patents protect 5-fluoro-pyrimidines with a sulfoximine group [70,71]. The compounds are usually highly selective for CDK9 over CDK2 and show strong antiproliferative activity in tumor cell lines. The most active examples (e.g., compound 23) had IC₅₀ values of around 2 – 6 nM for CDK9 and 70 – 300 nM for CDK2.

Related *N*-(pyridin-2-yl)pyridimidin-4-amines also have nanomolar potency towards CDK9 and CDK2. Compound 24 inhibits CDK9 with an IC_{50} of 4 nM, whereas CDK2 is nearly 20-fold less sensitive. These compounds also outperform other members of the family in cytotoxicity assays: compound 24 exhibits nanomolar potencies ranging from 18 to 55 nM [72].



A total of > 100 4-aryl-*N*-phenyl-1,3,5-triazin-2-amines are described in another patent that focuses on the synthesis and biological activity of compounds containing a sulfoximine group [73]. These compounds were tested on CDK9 and

CDK2 and are highly selective for CDK9 over CDK2. The representative compound 25 had IC_{50} values of 2 and 260 nM for CDK9 and CDK2, respectively, and its antiproliferative activity in the HeLa cell line was in the submicromolar range.

CDK inhibition data have also been reported for a series of 1,5-disubstituted pyridine derivatives [74]. A comparison of binding constants showed that these compounds always bind more strongly to CDK9 than to other CDKs. The most potent was compound 26, which had K_d values of < 100 nM for both CDK9 and CDK2. In addition, the compounds were tested against the HeLa and MDA-MB-468 cell lines.

Methylsulfone derivatives of *N*-(pyridin-2-yl)pyridine are discussed in a separate patent, which reports results from assays against CDKs and various cell lines for five compounds. One of them, compound 27, has IC₅₀ values of 2 and 170 nM against CDK9 and CDK2, respectively [75].

Another entry in this family of patents discloses a series of bioisosteric CDKIs with *N*-(pyridin-2-yl)pyridin-2-amine cores [76]. The most potent member of this group, compound **28**, displays single digit nanomolar IC₅₀ values towards the assayed CDKs (2 and 4 nM for CDK9 and CDK2, respectively). This inhibitor also displayed the highest cytotoxicity in cancer cell lines, achieving low nanomolar values (10 – 30 nM).

A third patent describes less active alkylsulfone derivatives [77]. Most of these compounds exhibit submicromolar IC_{50} values against the tested CDKs and are more potent against CDK9 than CDK2. However, their most active representative (compound 29) only exhibited micromolar activities in proliferation assays using the HeLa cell line.

Related *N*-phenyl-pyrimidin-4-amine derivatives are also strong CDK2 and CDK9 inhibitors [78]. Some of these agents were much more potent against CDK9 than CDK2: compound **30** had an IC₅₀ value of 6 nM against the former but 1300 nM against the latter. Their antiproliferative activity in cancer cell lines was submicromolar, ranging from 100 to 400 nM.

The fourth patent in this series covers *N*-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-amine derivatives containing sulfoximine or sulfone groups as nanomolar inhibitors of CDK9 [79]. Compound **31** displayed IC₅₀ values of 5 and 63 nM against CDK9 and CDK2, respectively, as well as mid-nanomolar IC₅₀ values as an inhibitor of proliferation in eight different cancer cell lines. The patent also presents data on the compounds' basic pharmacological properties (inhibition of carbonic anhydrase I, Caco-2 permeation and solubility).

The final patent in the series protects the selective inhibition of CDK9 for the treatment of midline carcinoma [80]. The most selective compound discussed in this report is 32, which inhibits only CDK9 (out of 23 different kinases) with a high potency (IC₅₀ = 1 nM).

A patent separate to the series discussed above described substituted aniline derivatives bearing diverse imidazole-fused cyclic systems that exhibit dual HDAC and CDK inhibitory activity [81]. The most active compound (out of 77 tested) was compound 33, which had IC_{50} values of 39 nM for CDK2 and 20 nM for HDAC.

Although several irreversible inhibitors of other oncogenic protein kinases have been described or are already in clinical trials, the first such CDKI was only recently disclosed [82,83]. This compound, designated THZ1 (34), selectively targets CDK7 via covalent modification of a cysteine residue located outside the canonical kinase domain. As expected, the compound decreases RNA polymerase II processivity by inhibiting CDK7 activity. The resulting blockage of transcription is responsible for the compound's cytotoxicity. Complete CDK7 inactivation is achieved after 3 – 4-h treatment in cellular models. THZ1 induces apoptosis and downregulates the MCL1 protein, a critical regulator of apoptosis. Importantly, THZ1 and related compounds are active against a wide range of cancer cell lines; lymphoma and leukemia cell lines are the most sensitive.

A new group of 4-(thiazol-5-yl)-pyrimidine derivatives [84] can be regarded as relatives of the 2-anilino-4-heteroaryl-pyrimidine derivatives previously developed by Cyclacel Pharmaceuticals [85,86]. Of the compounds reported, **35** was the most potent against CDK2 ($IC_{50} = 45$ nM), CDK9 ($IC_{50} = 19$ nM) and three cell lines (HCT116, MCF7 and MRC5).

An analogous group of 4-(thiazol-5-yl)-pyrimidine derivatives with pan-selectivity towards multiple CDKs achieved single digit nanomolar K_i values against CDK1, CDK2, CDK5 and CDK9 [87]. These compounds display nanomolar IC₅₀ values against various cancer cell lines and chronic lymphocytic leukemia cells ex vivo. One of the most potent example compounds, designated CDKI-73 (36), showed > 200-fold selectivity for primary leukemia cells relative to normal CD34⁺ cells. CDKI-73 is also active in ovarian cancer cells [88] measurements of the transcriptional inhibition of antiapoptotic proteins Mcl1 and XIAP showed that it exhibited synergistic effects when applied in conjunction with the nucleoside analog fludarabine [89]. Its underlying mechanism of action is also associated with inhibition of transcriptional kinase CDK9, which reduces levels of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 and induces apoptosis.

Isosteric imidazolyl pyrimidine compounds reportedly have inhibitory activity against HDAC and/or CDKs [90]. The most active member of this series was compound 37, which had IC_{50} values of 2 and 656 nM for CDK2 and HDAC1, respectively.

2.8 Arylpyridines and arylpyrimidines

In a collection of similar patents, Novartis disclosed a series of related biaryl compounds with very strong (nanomolar) activity against CDK9 in a biochemical assay [91-95]. Among the compounds described in this series was a collection of 68 pyrazinylpyridines such as 38. More than half of these compounds have IC_{50} values below 8 nM. A second patent protects a much larger set of bipyridines (316 compounds in total, including example 39). The next two patents in the series present 15 and 108 compounds with phenylpyridine



scaffolds (e.g., 40 and 41), many of which are also highly potent. The final patent describes 92 active aminoarylpyridines (example 42).

An independent patent describes loosely related arylpyrimidine inhibitors of CDK9 that also show nanomolar activities [96]. Compound 43 was shown to have *in vivo* hypoalgesic activity in several inflammation, inflammatory and neuropathic pain models.

Finally, various defined crystalline salt forms of the previously patented CDK and CDC7 kinase inhibitor 44

have been protected [97]. In addition, novel methods for the synthesis of this compound have been published [98].

2.9 Quinazolines

Several protein kinase inhibitors have pharmacophores based on 4-aminoquinaozolines including the EGF receptor inhibitor gefitinib. However, Senex Biotechnology has optimized this scaffold towards CDKs and disclosed compounds for inhibiting the CDKI pathway [99]. Their mechanism of action involves inhibition of CDK8 and CDK19; example compounds such as 45 are presented that show selectivity towards these kinases and limited activity towards 25 other kinases. The compounds did not interfere with the cell cycleinhibitory function of CDKIs and even enhanced the induction of G1 cell cycle arrest by CDKI proteins. They also blocked the development of senescent morphology in fibroblasts arrested by DNA damage.

Substituted 4-amino-quinazolines have also been protected because of their ability to enhance the expression of protein CDKIs such as p21WAF1 [100]. These compounds are active at submicromolar concentrations: the example compound 46 has K_d values of 240 nM for CDK8 and 99 nM for CDK19. High selectivity has been confirmed on a panel of 20 kinases. In cellular assays, these compounds inhibit the production of antiapoptotic proteins by senescent and irradiated fibroblasts. In addition, they were effective in models of senescence-related diseases, degenerative diseases of the CNS, Alzheimer's disease and cancer. Last but not the least, their potent activity suggests applications in antiviral therapy; one example shows that they dose-dependently reduce the abundance of HIV-infected cells with an EC₅₀ value of 0.6 μ M.

The anticancer activity of similar potent inhibitors of CDK8 and CDK19 is the subject of another patent application [101]. Compound 47 is reported to have K_d values of 140 nM for CDK8 and 90 nM for CDK19, whereas CDK9 was not significantly inhibited. The only other kinases exhibiting > 50% inhibition by this compound at a concentration of 2 μ M were MAP4K2 (69% inhibition) and YSK4 (59% inhibition). The compound is thus both highly potent and selective. 47 inhibits tumor growth in mouse models with xenografted breast cancer cell lines.

Similar compounds (example 48) were further patented as possible agents for the treatment of ER-positive breast cancer and especially for anti-estrogen-resistant breast cancers [102]. The example compounds block proliferation of estrogeninduced breast cancer MCF7 cells and potentiate the HER2/EGFR inhibitor lapatinib as well as the HER2 antibody trastuzumab, two modern anticancer drugs used for breast cancer therapy.

The described CDK8/CDK19 inhibitors have been further protected for use in the treatment of prostate cancer [103].

2.10 Other bicyclic compounds

Substituted isoquinoline-1,3-diones have also been identified as CDK-interacting compounds [104]. One patent describes the inhibitory activity of 877 novel compounds against CDK1, CDK2 and CDK4. The most potent compound 49 has high selectivity for CDK4 and CDK6, with IC_{50} values against these kinases of 4 and 1 nM, respectively, compared to 9.7 μ M for CDK1 and 3.1 μ M for CDK2. Compound 49 also exhibited anticancer activity in a mouse model when dosed at 2 mg/kg.

A series of 44 benzothiazines have been prepared, but biological data were only presented for one compound [105]. Example compound 50 was shown to inhibit protein kinases CDK9, CK2 and PIM1 with IC₅₀ values of 94, 83 and 226 nM, respectively. In addition, cytotoxicity data for this compound in a range of cancer cell lines were provided. In general, the compound was toxic to the cancer cell lines with submicromolar GI₅₀ values but did not cause cell death in the normal human stem cell line or the normal human fibroblast cell line. As such it appears to be selective for cancer cells.

Finally, some naphthyridine and isoquinoline derivatives with high potency against CDKs have been disclosed [106]. Compound 51 exhibited IC₅₀ values of 4 nM against CDK5, 66 nM against CDK1 and 40 nM against CDK2.

2.11 Thiazoles

Thiazole is a widely used scaffold in medicinal chemistry whose exploration has yielded a range of kinase inhibitors. Oxazolylmethylthiothiazoles comprise the cores of one set of CDKIs that are described in two patents [107,108]. These compounds, exemplified by 52, have IC₅₀ values below 0.1 μ M for CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 and CDK9, as well as IC₅₀ values between 1 and 0.1 μ M for CDK6 and CDK7. Many of them are also active against HDAC, with IC₅₀ values below 0.1 μ M, and exhibit antitumor activity in mouse xenograft models based on human melanoma, accute myelogeneous leukemia and multiple myeloma cell lines.

Differently substituted diamidothiazoles have been disclosed in related patents [109-111]. These compounds (e.g., 53) have been assayed against CHK1, CDK2, MEK1 and aurora kinases, but only exhibited moderate sensitivity towards CDK2.

The synthesis of 4-amino-3,5-disubstituted-thiazole derivatives such as 54 and their CDK2 inhibitory activity is disclosed in an Indian patent [112]. However, no biological data are provided.

The CDKI SNS032 (Figure 1), which features a thiazole moiety, was used as the basis for the modification of the classical anticancer drug chlorambucil [113]. Chlorambucil is an alkylating agent with no CDK activity, but its derivative 55 has nanomolar anti-kinase activity and inhibits CDK2 with an IC₅₀ of 2.7 nM. It also inhibits CDK3 and CDK9. This bifunctional compound was around 1500 times more potent than its parent chlorambucil in cancer cell lines.



2.12 Peptide inhibitors

Although there has been little wider interest in peptide inhibitors of protein kinases, partly because of their unattractive pharmacological properties, some fragments of natural peptide CDKIs have been investigated [114]. Specifically, inhibitory peptides derived from the sequence of the RB2 gene, which is a known CDK substrate, were recently prepared [115]. The peptide spanning the region between the amino acids 641 and 679 of the RB2 protein represented the shortest sequence able to maintain the parent peptide's activity. This fragment



strongly inhibited CDK2 activity *in vitro*, induced cell cycle arrest and reduced xenografted tumor growth *in vivo*.

3. Conclusions

This survey of patent literature published between 2009 and 2014 demonstrates that the field of CDKIs continues to attract academic and industrial interest despite the ongoing skepticism about these compounds and the number of dead end streets that have been explored. The recent FDA approval of palbociclib as the first medicine in this class of anti-cancer agents will perhaps change the situation even more dramatically. Particularly, high hopes are held out for other monospecific CDK4/CDK6 inhibitors, for which rational patient selection criteria exist and can be used to identify individuals who will clearly benefit from these therapies.

The success of the narrowly selective inhibitor palbociclib may be responsible for the particularly good progress that has been made in enhancing the selectivity of small molecule CDKIs. With the exception of one patent describing irreversible inhibitors specific to CDK7 and another discussing short peptides, all of the compounds discussed in this review are small molecules that act by competing with ATP. In addition, despite the high conservation of the ATP binding pocket of the CDKs, numerous nanomolar inhibitors have been disclosed that display over 1000-fold selectivity for an individual CDK over other members of the family (e.g., CDK4-specific pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 2, pyrimido[5,4-b]indolizine 4 or isoquinoline-1,3-dione 9).

Inhibitors of several other CDKs that previously attracted less interest have also emerged. These include CDK3, CDK8 and CDK19, which have clear links to cancer biology but whose inhibitors currently lack suitable oncological indications. However, further studies along these lines are also required for all of the other CDKs, and it is reasonable to hope that developments in omics technologies will soon link individual CDKs to specific oncological indications, potentially allowing some of these inhibitors or related compounds to become breakthrough therapies.

4. Expert opinion

There was relatively large gap between the time when it was first suggested that targeting CDKs may be useful in treating cancer and the recent approval of the first CDK-targeting drug. This was due to a number of factors including the low therapeutic indices of early CDKIs (especially when applied as monotherapies) and the lack of clear criteria for identifying patients who would respond well to such treatment. Although this gap persisted, there was a growing body of evidence showing that CDKIs have potent anticancer activity *in vitro* and considerable progress was made in deciphering their mechanisms of action in cancer biology. These results stoked great expectations concerning the clinical application of CDKIs, which unfortunately have not yet been met even though data supporting the merits of selectively inhibiting individual CDKs continue to accumulate.

As we have learned more about CDKs, the complexity of their regulatory networks has become more apparent, explaining the variable and often confusing activity of pan-selective CDKIs. The issue of selectivity is interesting in and of itself. It has been shown that simultaneous inhibition of CDK1, CDK2 and CDK9 is necessary for induction of apoptosis in U2OS cancer cells [116] whereas in melanoma, CDK2 depletion alone seems to be sufficient to achieve a response [117]. The available experimental evidence is not sufficient to confidently state the requirements and dependencies of specific cancer cells on CDKs. The mystery has been deepened by genetic analyses in mice, which have shown that some CDKs exhibit compensatory activity; if one is ablated or inhibited, another may fulfill its role [118]. Does such compensation also occur in (human) cancer cells? Given the multiple functions of CDKs and cyclins and the genetic heterogeneity of cancers, it is perhaps likely that inhibiting a single CDK in a certain cancer will not be a universally effective strategy. How then can we understand the complex network of altered signaling in cancers and design truly efficient therapies using CDKIs?

The answer may lie in extensive omics programs that can reveal genetic markers indicating the sensitivity of individual cancer types to specific anticancer drugs. Clearly defined interactions involving CDKs can also be identified via synthetic lethality screens [119]. Synthetic lethality is a property of a gene pair in which one gene allows a cell to tolerate the loss of another that would be lethal in the absence of the first. These screens have already enabled the identification of several genes that have such lethal interactions with certain CDKs. One of the most frequent alterations in cancers is overexpression of K-Ras, which has been identified as a potential sensitizer of CDK1 knockdown [120], although in a different screen K-Ras overexpression was linked to lethality following CDK4 inhibition [20]. The latter synthetic lethal interaction was validated in mice with induced K-Ras overexpression that were treated with palbociclib; after 30 days, < 20% of all animals developed lesions compared to 75% for control mice.

Some tumors are characterized by the inactivation of tumor suppressor genes. Although the reactivation of these genes might in principle be an attractive way of treating these cancers, it is usually challenging to achieve. However, the inactivation of the Von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor gene in renal cell carcinoma has been shown to provide a therapeutic opportunity because it represents a sensitizing condition for CDK6 inhibition [121]. The lethal interaction between VHL and CDK6 has been validated in studies using CDK4/CDK6 inhibitors, suggesting a new indication for these compounds in clinical settings.

A potent oncogene MYC has been found to have at least independent synthetic lethal relationships with two CDK1 and CDK9 in triple-negative breast cancer cell lines and hepatocellular carcinomas, respectively [122,123]. The closely related MYCN, an oncogene often amplified in neuroblastomas, was also shown to strongly sensitize cells to CDK2 ablation [21]. In all these cases, pharmacological suppression of the relevant CDKs was used to validate the interactions. It is, however, unclear whether these interactions can be translated into clinical applications for the drugs involved because they either selectively target CDK4/ CDK6 or display broader anti-CDK activity. Truly monospecific CDK1 and CDK2 inhibitors have yet to be disclosed and their development seems to be unfeasible due to the high structural similarity of the active sites of CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 and CDK9.

Additional synthetic lethal interactions between PARP1/2 and CDK12 or CDK5 were identified independently during a search for genes that might determine sensitivity to olaparib, a PARP inhibitor recently approved for cancer therapy [124,125]. Although the ablation of both CDKs significantly increased olaparib's potency, potent and selective inhibitors of these kinases are not available to confirm these interactions. On the other hand, CDK12 is one of few genes known to be significantly mutated in certain ovarian cancers and therefore could be used as a biomarker for predicting olaparib sensitivity.

The interactions discussed above could serve as a basis for careful selection of patients and to support the rational design of combination therapies utilizing CDKIs. This will be particularly important and interesting for newly disclosed inhibitors of less explored kinases such as CDK3 or CDK19.

Declaration of interest

V Malinkova was supported by the Ministry of Education (grant L01204), V Krystof was supported by the Czech science foundation (grant 15-15264) 15-15264 and J Vylíčil was supported by the Ministry of Education (grant CZ.1.05/3.1.00/14.0327). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

- Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nat Rev Cancer 2009;9:28-39
- 2. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996;274:1672-7
- Malumbres M, Barbacid M. Milestones in cell division : To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat Rev Cancer 2001;1:222-31
- Lim SH, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development 2013;140:3079-93
- Porter DC, Zhang N, Danes C, et al. Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. Mol Cell Biol 2001;21:6254-69
- Bruyere C, Meijer L. Targeting cyclindependent kinases in anti-neoplastic therapy. Curr Opin Cell Biol 2013;25:772-9
- Fischer PM, Endicott J, Meijer L. Cyclin-dependent kinase inhibitors. Prog Cell Cycle Res 2003;5:235-48
- Chao SH, Fujinaga K, Marion JE, et al. Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. J Biol Chem 2000;275:28345-8
- Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P. 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 2004;64:262-72
- Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. Nat Rev Drug Discov 2015;14:130-46
- The newest review on cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cancer therapy.
- Mariaule G, Belmont P. Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? a short survey. Molecules 2014;19:14366-82
- Goh KC, Novotny-Diermayr V, Hart S, et al. TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with

potent anti-leukemic properties. Leukemia 2012;26:236-43

- Albanese C, Alzani R, Amboldi N, et al. Dual targeting of CDK and tropomyosin receptor kinase families by the oral inhibitor PHA-848125, an agent with broad-spectrum antitumor efficacy. Mol Cancer Ther 2010;9:2243-54
- Guzi TJ, Paruch K, Dwyer MP, et al. Targeting the replication checkpoint using SCH 900776, a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening. Mol Cancer Ther 2011;10:591-602
- Daud AI, Ashworth MT, Strosberg J, et al. Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol 2015;33(9):1060-6
- Smolewski P. Terameprocol, a novel sitespecific transcription inhibitor with anticancer activity. IDrugs 2008;11:204-14
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. Mol Cancer Ther 2004;3:1427-37
- First CDK 4/6 inhibitor heads to market. Cancer Discov 2015;5(4):339-40
- Thangavel C, Dean JL, Ertel A, et al. Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. Endocr Relat Cancer 2011;18:333-45
- 20. Puyol M, Martin A, Dubus P, et al. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell 2010;18:63-73
- Molenaar JJ, Ebus ME, Geerts D, et al. Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:12968-73
- 22. Kang J, Sergio CM, Sutherland RL, Musgrove EA. Targeting cyclindependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. BMC Cancer 2014;14:32

- 23. Novartis, Astex Therapeutics. Pyrrolopyrimidine compounds as cdk inhibitors. WO020675A1; 2010
- Novartis. Pyrrolopyrimidine compounds as inhibitors of cdk4/6. WO101409A1; 2011
- Amgen. Fused pyridine, pyrimidine and triazine compounds as cell cycle inhibitors. WO085185A1; 2009
- 26. Tavares FX, Strum JC. Cdk inhibitors. WO061156A1; 2012
- G1 Therapeutics. Transient protection of normal cells during chemotherapy. WO144326A1; 2014
- Novartis. Pharmaceutical combination comprising binimetinib. WO097125A1; 2014
- 29. Novartis. Combination therapy. WO085318A1; 2014
- Novartis. Combination comprising a cyclin dependent kinase 4 or cyclin dependent kinase (cdk4/6) inhibitor and an mtor inhibitor for treating cancer. WO130232A1; 2011
- 31. Weiss GJ, Hidalgo M, Borad MJ, et al. Phase I study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of PHA-848125AC, a dual tropomyosin receptor kinase A and cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. Invest New Drugs 2012;30:2334-43
- Nerviano Medical Sciences. Polymorphs of 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl) phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-nmethyl-pyridine-2-carboxamide. WO058006A1; 2010
- Nerviano Medical Sciences. Use of a cdk inhibitor for the treatment of glioma. WO012733A1; 2010
- Nerviano Medical Sciences. Therapeutic combination comprising a cdks inhibitor and an antineoplastic agent. WO012777A1; 2010
- Nerviano Medical Sciences. Cdk inhibitor salts. WO125004A1; 2010
- Novartis, Astex. Salt(s) of 7-cyclopentyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-7h-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic acid dimethylamide and processes of making thereof. US0115878A1; 2012
- Pfizer. Solid forms of a selective cdk4/6 inhibitor. WO128588A1; 2014

V. Malínková et al.

- Novartis. Deuterated pyrrolopyrimidine compounds as inhibitors of cdk4/6. WO101417A1; 2011
- Piramal. A process for preparation of an intermediate of the pyrrolidine substituted flavones. WO128523A1; 2014
- Piramal. An improved process for preparation of an intermediate of the pyrrolidine substituted flavones. WO128524A1; 2014
- Council of Scientific and Industrial Research. Rohitukine analogs as cyclindependent kinase inhibitors and a process for the preparation thereof. WO170914A1; 2014
- 42. The Hong Kong University of Science and Technology. Cdk5 inhibitors and therapeutic uses thereof. WO069334A1; 2011
- Tragara Pharmaceuticals, S*Bio. Solid state forms of macrocyclic kinase inhibitors. WO097525A1; 2011
- CNIO. Macrocyclic compounds and their use as cdk8 inhibitors. WO001310A1; 2013
- Jorda R, Paruch K, Krystof V. Cyclin-dependent kinase Inhibitors Inspired by Roscovitine: Purine Bioisosteres. Curr Pharm Des 2012;18:2974-80
- Palacký University Olomouc. Substituted 6-(2-hydroxybenzylamino)purine derivatives, their use as medicaments and compositions containing these derivatives. WO139289A1; 2010
- Palacký University Olomouc. Substituted 6-(2-aminobenzylamino)purine derivatives, their use as medicaments and preparations containing these compounds. WO085924A2; 2010
- Palacký University Olomouc. 2substituted-6-biarylmethylamino-9cyclopentyl-9H-purine derivatives, use thereof as medicaments, and pharmaceutical compositions. WO121764A2; 2014
- Gucky T, Jorda R, Zatloukal M, et al. A novel series of highly potent 2,6,9-Trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. J Med Chem 2013;56:6234-47
- Haider C, Grubinger M, Reznickova E, et al. Novel inhibitors of cyclindependent kinases combat hepatocellular carcinoma without inducing

chemoresistance. Mol Cancer Ther 2013;12:1947-57

- Georgetown University. Fluorescent cdk inhibitors for treatment of cancer. WO019967A1; 2010
- Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. Mol Cancer Ther 2010;9:2344-53
- Schering Corp. 2-fluoropyrazolo[1,5-a] pyrimidines as protein kinase inhibitors. WO070567A1; 2009
- 54. Centre National de la Recherche Scientifique. Perharidines as cdk inhibitors. WO034411A1; 2009
- Centre National de la Recherche Scient. Perharidines as cdk inhibitors. WO034475A2; 2009
- Centre National De La Recherche Scientifique. Perharidines as cdk inhibitors. US0280065A1; 2010
- Centre National de la Recherche Scientifique. Preparation of pyrazolo[1,5a]-1,3,5-triazine derivatives as inhibitors of cyclin-dependent kinases, casein kinase 1 and DYRK1A kinase for treating diseases including B-cell chronic lymphoid leukemia. FR2943058A1; 2010
- Centre National De La Recherche Scientifique. Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5triazine derivatives, preparation thereof, and therapeutic use thereof. WO103486A1; 2010
- Lead Discovery Center. Pharmaceutically active pyrazolo-triazine derivatives. WO128029A1; 2013
- Lead Discovery Center. Pyrazolo-triazine derivatives as selective cyclin- dependent kinase inhibitors. WO128028A1; 2013
- Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. Nat Cell Biol 1999;1:60-7
- 62. Scott EN, Thomas AL, Molife LR, et al. A phase I dose escalation study of the pharmacokinetics and tolerability of ZK 304709, an oral multi-targeted growth inhibitor (MTGI((TM))), in patients with advanced solid tumours. Cancer Chemother Pharmacol 2009;64:425-9

- Anygen. Indirubin-3'-oxime derivatives as potent cyclin dependent kinase inhibitors. WO096676A2; 2011
- 64. Gilead. Oxindolyl inhibitor compounds. WO009166A1; 2010
- 65. Senex Biotechnology. Specific inhibitors of cdk3. WO089450A1; 2014
- Noscira. Indole-pyrimidine derivatives and their therapeutic uses. WO149976A1; 2013
- 67. De Montfort University. Compounds and uses. CA2597193A1; 2009
- Selvita. Substituted tricyclic benzimidazoles as kinase inhibitors. WO072435A1; 2014
- Novartis, Astex Therapeutics. Imidazole derivatives and their use as modulators of cyclin dependent kinases. WO125402A1; 2010
- Bayer. Disubstituted
 5-fluoro-pyrimidines. WO037896A1; 2013
- Bayer. Disubstituted 5-fluoro pyrimidine derivatives containing a sulfoximine group. WO037894A1; 2013
- 72. Bayer. N-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4amine derivatives containing a sulfone group. WO060493A2; 2014
- Bayer. 4-aryl-N-phenyl-1,3,5-triazin-2amines containing a sulfoximine group. WO160034A1; 2012
- Lead Discovery Center, Bayer. Pharmaceutically active disubstituted pyridine derivatives. WO117059A1; 2012
- Bayer. 5-fluoro-N-(pyridin-2-yl)pyridin-2-amine derivatives containing a sulfone group. WO060375A2; 2014
- Bayer. 5-fluoro-N-(pyridin-2-yl)pyridin-2-amine derivatives containing a sulfoximine group. WO076091A1; 2014
- Bayer. 4-(ortho)-fluorophenyl-5fluoropyrimidin-2-yl amines containing a sulfone group. WO060376A1; 2014
- Bayer. 4-(ortho)-fluorophenyl-5fluoropyrimidin-2-yl amines containing a sulfoximine group. WO076028A1; 2014
- Bayer. N-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4amine derivatives containing a sulfoximine group. WO076111A1; 2014
- Lead Discovery Center GMBH, Max-Planck-Gesellschaft. Cdk9 inhibitors in the treatment of midline carcinoma. WO026874A1; 2013

CDK inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 - 2014)

- 81. Gilead. Fused heterocyclyc inhibitor compounds. WO009155A2; 2010
- Dana-Farber Cancer Institute. Inhibitors of cyclin-dependent kinase 7 (cdk7). WO063068A1; 2014
- Kwiatkowski N, Zhang TH, Rahl PB, et al. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. Nature 2014;511:616-20
- Identification of first irreversible inhibitor of CDK7.
- The University of Nottingham. Pyrimidines, triazines and their use as pharmaceutical agents. WO118567A2; 2009
- Cyclacel. N-(4-(4-methylthiazol-5-yl) pyrimidin-2-yl) -n-phenylamines as antiproliferative compounds. WO029248A1; 2003
- Cyclacel. Inhibitors of cyclin dependent kinases as anti-cancer agent. WO079193A1; 2002
- Cancer Research Technology. Therapeutic compounds. WO156780A1; 2013
- Lam F, Abbas AY, Shao H, et al. Targeting RNA transcription and translation in ovarian cancer cells with pharmacological inhibitor CDKI-73. Oncotarget 2014;5:7691-704
- Walsby E, Pratt G, Shao H, et al. A novel Cdk9 inhibitor preferentially targets tumor cells and synergizes with fludarabine. Oncotarget 2014;5:375-85
- 90. Gilead. Imidazolyl pyrimidine inhibitor compounds. US0009990A1; 2010
- Novartis. Pyrazinylpyridines useful for the treatment of proliferative diseases. WO026904A1; 2011
- Novartis. Bipyridines useful for the treatment of proliferative diseases. WO026911A1; 2011
- 93. Novartis. Heteroaryl compounds as kinase inhibitors. WO026917A1; 2011
- 94. Novartis. Phenyl-heteroaryl amine compounds and their uses. WO066065A1; 2012
- 95. Novartis. 3-(aminoaryl)-pyridine compounds. WO066070A1; 2012
- Ingenium Pharmaceuticals. Inhibitors of protein kinases. WO047359A1; 2009
- Nerviano Medical Sciences. Crystalline cdc7 inhibitor salts. WO057960A1; 2011

- Nerviano Medical Sciences. Process for the preparation of 5-(2-amino-pyrimidin-4-yl)-2-aryl-1H-pyrrole-3-carboxamides. WO054714A1; 2011
- Senex Biotechnology. Cdki pathway inhibitors and uses thereof. US0071477A1; 2012
- Porter DC, Roninson IB, Wentland MP. Cdki pathway inhibitors and uses thereof. US0378683A1; 2014
- Senex Biotechnology. Cdk8/ cdk19 selective inhibitors and their use in anti-metastatic and chemopreventative methods for cancer. WO116786A1; 2013
- Senex Biotechnology. Inhibitors of cdk8/19 for use in treating estrogen receptor positive breast cancer. WO134169A1; 2014
- University of South Carolina. Method for treating prostate cancer. WO071143A1; 2014
- 104. Wyeth. Anticancer agents; cyclin dependent kinase inhibitors; (4Z)-6-[(3aminophenyl)amino]-4-(([4-(piperidin-1ylmethyl)phenyl]amino)methylene) isoquinoline-1,3(2H,4H)-dione for example. US7713994B2; 2010
- 105. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. Substituted 2-benzylidene-2Hbenzo[b][1,4]thiazin-3(4H)-ones, derivatives thereof, and therapeutic uses thereof. US0086941A1; 2014
- Sanofi. Preparation of naphthyridine and isoquinoline derivatives as CDK inhibitors. INKO01289A; 2011
- Curis. Cdk inhibitors containing a zinc binding moiety. WO036016A1; 2009
- 108. Curis. Cdk inhibitors. WO075542A1; 2010
- Schering Corp. Diamido thiazole derivatives as protein kinase inhibitors. WO058730A1; 2009
- Schering Corp. Heterocyclic urea and thiourea derivatives and methods of use thereof. WO058739A1; 2009
- Schering Corp. Thiazole carboxamide derivatives and their to treat cancer. WO058729A2; 2009
- 112. Chhabria MT, Patel SM, Suthar MP, et al. Preparation of 4-amino-3,5disubstituted-thiazole-2(3H)-thione/one series as novel class of CDK2 inhibitors. INMU01493A; 2009

- Crystal Biopharmaceuticals. Nitrogen mustard derivatives. WO049279A2; 2013
- 114. Peyressatre M, Prevel C, Pellerano M, Morris MC. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. Cancers 2015;7:179-237
- Giordano A. Peptide inhibitors of cyclindependent kinase activity and uses thereof. US0054333A1; 2009
- 116. Cai DP, Latham VM, Zhang XX, Shapiro GI. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclindependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. Cancer Res 2006;66:9270-80
- 117. Du JY, Widlund HR, Horstmann MA, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. Cancer Cell 2004;6:565-76
- Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. Nature 2007;448:811-U8
- Kaelin WG. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. Nat Rev Cancer 2005;5:689-98
- Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. Nature 2009;462:108-U122
- 121. Bommi-Reddy A, Almeciga I, Sawyer J, et al. Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL-/- cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:16484-9
- 122. Liu Y, Zhu YH, Mao CQ, et al. Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. J Control Release 2014;192:114-21
- 123. Huang CH, Lujambio A, Zuber J, et al. CDK9-mediated transcription elongation is required for MYC addiction in hepatocellular carcinoma. Genes Dev 2014;28:1800-14
- 124. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, et al. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. Embo J 2008;27:1368-77
- 125. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, et al. Genome-wide profiling of genetic

V. Malínková et al.

synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. Cancer Res 2014;74:287-97

Affiliation

Veronika Malínková, Jakub Vylíčil & Vladimír Kryštof[†] [†]Author for correspondence Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Laboratory of Growth Regulators, Šlechtitelů 11, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic Tel: +420 585 634 854; Fax: +420 585 634 870; E-mail: vladimir.krystof@upol.cz

PŘÍLOHA II.

Malínková V., Řezníčková E., Jorda R., Gucký T., Kryštof V. (2017) Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, doi: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032.

Accepted Manuscript

Trisubstituted purine inhibitors of PDGFR α and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1

Veronika Malínková, Eva Řezní čková, Radek Jorda, Tomá š Gucký, Vladimír Kryštof

PII: DOI:	S0968-0896(17)31763-7 https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032
Reference:	BMC 14037
To appear in:	Bioorganic & Medicinal Chemistry
Received Date:	5 September 2017
Revised Date:	12 October 2017
Accepted Date:	20 October 2017



Please cite this article as: Malínková, V., Řezní čková, E., Jorda, R., Gucký, T., Kryštof, V., Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2017), doi: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1

Veronika Malínková^{a,b}, Eva Řezníčková^b, Radek Jorda^b, Tomáš Gucký^a, Vladimír Kryštof^b

^aDepartment of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^bLaboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

*Corresponding Author. Vladimír Kryštof, Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic. Phone: +420585634854, Fax: +420585634870. E-mail: vladimir.krystof@upol.cz

CCER

1

Abstract

Inhibition of protein kinases is a validated concept for pharmacological intervention in cancers. Many kinase inhibitors have been approved for clinical use, but their practical application is often limited. Here, we describe a collection of 23 novel 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with nanomolar inhibitory activities against PDGFR α , a receptor tyrosine kinase often found constitutively activated in various tumours. The compounds demonstrated strong and selective cytotoxicity in the human eosinophilic leukemia cell line EOL-1, whereas several other cell lines were substantially less sensitive. The cytotoxicity in EOL-1, which is known to express the *FIP1L1-PDGFRA* fusion gene encoding an oncogenic kinase, correlated significantly with PDGFR α inhibition. EOL-1 cells treated with the compounds also exhibited dose-dependent inhibition of PDGFR α autophosphorylation and suppression of its downstream signaling pathways with concominant G₁ phase arrest, confirming the proposed mechanism of action. Our results show that substituted purines can be used as platforms for preparing tyrosine kinase inhibitors with specific activity towards eosinophilic leukemia.

Highlights

- New 2,6,9-trisubstituted purines were prepared
- Compounds display nanomolar antiproliferative activities in eosinophilic leukemia cell line
- Mechanism of action in cells correlates with inhibition of PDGFRα

Abbreviations

PDGFRα, platelet derived growth factor receptor alpha; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; TK, tyrosine kinase

1. Introduction

The development of protein kinase inhibitors has progressed dramatically in the past years: over 30 kinase inhibitors have been approved as drugs, and several others are undergoing advanced clinical evaluation [1, 2]. Oncogenic kinases often arise as a result of mutations, overexpression, or chromosomal translocations. Moreover, while chromosomal translocations in hematological malignancies are rarer than in solid tumors, they are significant in cancer therapy as well as in tumor initiation and progression [3].

Platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRA, CD140A) is a type III receptor tyrosine kinase (TK) that regulates cell proliferation, differentiation, adhesion and survival. Ligand binding activates the kinase, stimulating cellular signaling proteins including mitogen-activated protein kinases (MAPKs), signal transducers and activators of transcription (STATs), Src and phosphatidylinositol-3 kinases. Constitutively activated forms of PDGFRA have been found in various tumours, arising from various mutations in gastrointestinal stromal tumors [4] and melanoma [5], missense mutations in childhood acute myeloid leukemia [6], reciprocal translocations in chronic myeloid leukemia, and deletions that give rise to a fusion protein in chronic eosinophilic leukemia [7]. A typical fusion gene encoding a constitutively activated PDGFRA form is FIP1L1-PDGFRA, which originates from an 800-kb cryptic interstitial deletion in chromosome 4q12. The fusion gene encodes a ligand-independent and constitutively active TK that confers growth factor-independency to hematopoietic cells and is highly sensitive to the kinase inhibitor imatinib [8, 9]. This fusion protein is estimated to occur in 10-20% of eosinophilia cases. The FIP1L1-PDGFRA fusion has been found in chronic eosinophilic leukemia, hypereosinophilic syndrome, eosinophilia-associated myeloproliferative disorders, acute myeloid leukemia, and lymphoblastic T-cell non-Hodgkin lymphoma [3]. Other fusion partners include BCR, striatin and ETV6 [3].

Various TK inhibitors have shown activity in FIP1L1-PDGFRA-positive cells, including imatinib [9], sorafenib [10] or ponatinib [11]. These compounds blocked proliferation and induced apoptosis, primarily as a result of direct FIP1L1-PDGFR α inhibition [9]. In clinical settings, however, most patients require life-long treatment with these agents, and resistance has developed in some cases [8, 12]. There is even a recent report of a patient with imatinib non-responsive chronic eosinophilic leukemia, although in that patient's tumor, PDGFRA was fused with ETV6 rather than FIP1L1 [13]. Identification of novel PDGFR α inhibitors or thorough selectivity determination for previously described compounds is therefore still a challenge.

We have previously prepared several series of 2,6,9-trisubstituted purines [14, 15] and related purine isosteres such as pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines [16] and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines [17] that selectively inhibit cyclin-dependent kinases (CDK). Optimization of these compounds yielded other potent CDK inhibitors as well as new compounds with different kinase selectivities. Changes in

selectivity were achieved by using different substitution patterns [18], or more simply, by replacing the 6-benzylamino moiety with a 6-phenylamino group. Independent studies confirmed that this shortening conferred potency against various other kinases, including TKs, while retaining some degree of CDK inhibition. Such compounds (some of them are illustrated in **Fig. 1**) include the PAK4 inhibitor CGP74514A [19], the MER receptor inhibitor anilinopurine C52 [20], the SRC and VEGFR2 inhibitor BDBM50451553 [21], and the SRC and BCR-ABL inhibitor AP23464 [22]. Importantly, the 6phenylaminopyrimidine motif present in all these compounds is also present in several TK inhibitors such as erlotinib, gefitinib, and lapatinib (**Fig. 1**), suggesting that substituted purines may also serve as a source of TK inhibitors.



R-roscovitine

CGP74514A

BDBM50451553

AP23464



Fig. 1. Some inhibitors of cyclin-dependent kinases and tyrosine kinases.

In this paper we describe potent PDGFR α inhibitors with selective activity against the eosinophilic leukemia cell line EOL-1. Structure-activity analyses and co-crystal structures of CDKs with purine inhibitors indicated that the optimal substituents at positions 2 and 9 are branched alkyl groups with polar substituents (e.g. aminocyclohexylamine) and a small alkyl or cycloalkyl group, respectively [15, 23, 24]. We expected that 2-(4-aminocyclohexyl)amino-6-anilinopurines with enlarged substituents at position 9 would be weaker CDK inhibitors but more effective inhibitors of TKs, and thus more active towards cell lines with aberrant TK expression.

2. Results

2.1. Synthesis

The three-step synthesis of 2,6,9-trisubstituted purines started from commercially available 2,6dichloropurine, which was initially alkylated at N^9 with a suitable alcohol under Mitsunobu conditions to obtain a 2,6-dichloro-9-substituted-9*H*-purine with good regioselectivity [14-15]. The crude product was purified by crystallization from methanol or column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 2:1).



Scheme 1. General reaction scheme for synthesis of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives. (a) The appropriate alcohol R^1 -OH (2 equiv), PPh₃ (1.2 equiv), dry THF, DIAD (1.2 equiv), 0°C; (b) the appropriate amine or benzylamine (1.2 equiv), DIPEA (3 equiv), *n*-propanol, 100-120 °C (sealed tube), 3-6 h; (c) *trans*-1,4-diaminocyclohexane (15 equiv), *n*-butanol, 160°C (sealed tube), 4-10 h.

The second step was nucleophilic substitution at the *C6* purine position with a suitable substituted aniline or benzylamine. This reaction was performed in *n*-propanol, using *N*,*N*-diisopropylethylamine as the base. The reaction temperature was kept in the range of 100-120 °C for 3-6 h, depending on aniline reactivity. Crude products were purified by crystallization or column chromatography (petroleum ether: ethyl acetate, 2:1).

The final step was nucleophilic aromatic substitution at the *C2* purine position using a large excess of *trans-1,4*–diaminocyclohexane at 160 °C for a few hours via solution-phase synthesis strategy or via microwave heating. The use of microwave irradiation significantly reduced the time required for this reaction. Final compounds were purified by crystallization or column chromatography on silica.

Compound ^a	R ¹	R ²
4a	butyl	3-chlorobenzyl
4b	isopentyl	3-chlorobenzyl
4c	4-methoxybenzyl	3-chlorophenyl
4d	benzyl	3-chlorophenyl
4e	3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl	3-chlorophenyl

Table 1. Structures of novel 2,6,9-trisubstituted purine analogues used in this study.

4f	isopentyl	2,4-dimethoxypheny
4g	butyl	3,5-dimethoxypheny
4h	hexyl	3,5-dimethoxypheny
4i	cyclohexyl	4-hydroxyphenyl
4j	cyclohexyl	4-chlorophenyl
4k	hexyl	4-hydroxyphenyl
41	isopentyl	3,5-dimethoxypheny
4m	hexyl	3-chlorophenyl
4n	3-methylbut-2-en-1-yl	3-chlorophenyl
40	butyl	phenyl
4p	hexyl	4-chlorophenyl
4q	butyl	3-chlorophenyl
4r	isopentyl	4-hydroxyphenyl
4s	isopentyl	phenyl
4t	isopentyl	3-hydroxyphenyl
4u	isopentyl	3-chlorophenyl
4v	butyl	4-chlorophenyl
4w	isopentyl	4-chlorophenyl
2	1 - 2	

^aSee Scheme 1 for position of R¹ and R².

2.2. Biological and biochemical activity

All the prepared compounds were subjected to biochemical assays to determine their activity against CDK2 and PDGFR α , and cytotoxicity assays using 5 cell lines with differing expression of oncogenic TKs. We also performed phenotype screening to evaluate cell cycle changes in treated cells. The results obtained are summarized in **Table 2**. The previously reported structure-activity relationships for 2,6,9-trisubstituted purines suggest that position 6 can host both phenyl and benzyl groups without significantly altering activity against CDK2 (compare **4u** with **4b**, **4q** with **4a**) [24, 25]. Further substitution of the phenyl or benzyl ring with chlorine, hydroxy or methoxy groups also did not greatly affect potency. On the other hand, CDK2 inhibition was clearly weakened by increasing the size of the substituent in position 9. The most potent CDK2 inhibitors bear a butyl chain in this position; bulkier substituents (ranging from isopentyl in **4b** to the bulkier benzyl group in **4d** or the longer geranyl unit in **4e**) clearly reduced activity against CDK2.

9^cP

In contrast to CDK2 inhibitors, the presence of an anilino function is necessary for PDGFR α inhibition; while several anilino derivatives exhibited IC₅₀ values below 0.1 μ M, its replacement with a homologous benzyl group completely eliminated this activity (compounds **4a** and **4b**). This is consistent with several studies on kinase inhibitor selectivity, which reported that the 2,9-disubstituted-6-benzylpurine roscovitine also does not inhibit PDGFR α or other tyrosine kinases (IC₅₀ > 10 μ M) [23, 26, 27]. Other reports however showed that 6-anilino purines can inhibit tyrosine kinases. For example, AP23464 was identified as a potent inhibitor of SRC and BCR-ABL [28, 22], and compound C52 inhibits MER [20].

Analogues bearing chlorine- or hydroxyl-functionalized anilino groups at the C6 position did not exhibit appreciably stronger activity towards PDGFRα than the parent compound with a nonfunctionalized anilino group. However, dimethoxylated anilino groups were usually detrimental to activity: compounds **4h**, **4f**, **4g** exhibited only micromolar inhibition. The activities of **4f** and **4l** suggest that 3,5-dimethoxy substitution is preferred to the 2,4- configuration.

Our results also demonstrate that the substituent at position 9 of the purine should not be too bulky because benzyl derivatives **4c** and **4d** and geranyl derivative **4e** were among the weakest inhibitors, with IC_{50} values above 1 μ M. PDGFR α was most sensitive to derivatives with linear or branched chains of 4-5 carbon atoms at the N⁹ position.

compound	IC ₅₀ (μM)		GI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)		relative G ₁ /G ₂ -M rat			atio ^b	
	CDK2	PDGFRα	HCC827	BT474	MCF7	K562	EOL-1	EOL-1	HCC827	K562
CGP74514A	0.017	>20	12.2	5.4	3.3	4.8	0.99	1.28	0.29	0.48
lapatinib	>20	>20	22.3	0.2	8.1	5.7	0.41	1.17	12.1	0.81
4a	0.207	>20	10.6	4.7	2.2	4.33	0.347	0.99	0.26	1.27
4b	0.306	>20	16.7	6.6	4.7	3.12	1.331	1.77	2.50	1.85
4c	5.504	7.655	18.7	8.2	4.8	2.83	0.528	0.96	1.94	1.43
4d	2.830	5.099	13.7	10.2	3.6	2.99	0.381	0.99	10.37	1.76
4e	7.170	4.739	18.2	4.3	3.6	2.21	0.585	1.13	1.94	1.78
4f	5.967	3.197	32.9	7.9	6.3	5.45	0.633	1.65	23.09	1.00
4g	0.442	1.496	20.1	15.6	4.5	2.41	0.369	1.30	1.35	0.82
4h	0.680	1.412	9.1	3.7	3.5	1.9	0.384	3.78	9.67	1.40
4i	1.441	1.233	32.5	27.3	9.6	8.91	0.216	2.44	9.61	0.95
4j	0.965	1.090	9.1	4.1	2.3	1.68	0.135	2.64	2.68	0.79
4k	0.485	0.452	24.7	7.7	3.5	5.39	0.185	2.50	0.44	0.69
41	0.980	0.290	11.2	5.9	4.5	2.52	0.135	3.71	1.47	1.60
4m	0.500	0.195	10.2	5.1	2.7	2.29	0.313	1.86	7.37	0.79
4n	0.227	0.187	13.5	7.0	4.2	3.48	0.076	3.10	2.69	0.75
40	0.134	0.160	9.0	4.9	2.2	3.22	0.021	4.93	0.33	2.29
4p	0.433	0.156	11.7	5.5	4.2	2.11	0.438	4.61	5.20	0.88
4q	0.132	0.154	7.2	5.1	2.0	2.01	0.160	10.75	0.54	0.78
4r	0.490	0.150	14.4	7.7	3.1	4.62	0.031	1.17	2.71	0.73
4s	0.627	0.096	21.7	6.4	5.4	3.46	0.011	1.67	0.39	1.20
4t	0.513	0.066	21.3	14.7	12.6	7.6	0.062	8.94	5.60	1.22
4u	0.275	0.066	10.3	3.8	2.1	1.54	0.064	6.00	1.33	1.10
4v	0.117	0.060	10.8	7.3	2.1	2.69	0.054	6.43	0.28	1.52
4w	0.319	0.059	10.2	5.1	2.7	1.81	0.088	7.80	3.50	0.81

Table 2. Activity of novel compounds in cellular and biochemical assays.

^a Data are averaged from at least two determinations.

^b Cell cycle effect at a dose corresponding to the GI_{50} value. Data were normalized against results for untreated controls, so a relative G_1/G_2 -M ratio close to 1 means the tested compound had no effect.

Cancer cell lines for cytotoxicity assays were selected with respect to their expression of oncogenic kinases. The prepared compounds were active against every cell line included in the panel, but their activities were quite distinct (**Table 2**). The non-small cell lung cancer cell line HCC827 and the breast cancer cell line BT474 both have activating mutations in EGFR, and responded weakly to the compounds, with mid-micromolar GI₅₀ values. Conversely, the breast cancer cell line MCF7 responded strongly, with a single-digit micromolar GI₅₀ value, despite having no known tyrosine kinase mutations. The leukemic cell line K562, which expresses the BCR-ABL fusion kinase, was similarly responsive.



Fig. 2. Pearson correlation coefficients for measured parameters. Stars **in**dicate statistical significance (* P<0.01, ** P<0.001).

The compounds had similar cytotoxicity patterns in all tested cell lines other than the eosinophilic leukemia cell line EOL-1 (**Table 2**). Most of them were much more active against this line (with submicromolar to mid-nanomolar GI_{50} values) and had completely different relative activity levels, indicating a different mechanism of action in this line. We hypothesized that this may be due to the EOL-1 line's expression of the *FIP1L1-PDGFRA* fusion gene, which encodes an oncogenic variant of PDGFR α . This line has been identified as an *in vitro* model for studying FIP1L1-PDGFRA-positive chronic eosinophilic leukemia and for analysing FIP1L1-PDGFR α inhibitors [9]. Indeed, we found that the compounds' cytotoxicity in EOL-1 correlated strongly with PDGFR α inhibition as determined in a biochemical assay (Pearson coeff. = 0.76, p<0.001, **Fig. 2**).

To our knowledge, CDK inhibitors usually induce cell cycle arrest preferentially in G_2 -M or in both G_1 and G_2 -M, whereas receptor tyrosine kinase inhibitors often produce clear G_1 phase arrest. We therefore performed cell cycle measurements in the EOL-1, HCC827 and K562 cell lines after treatment with the new compounds. For each compound, we measured the cell cycle changes after 24 h treatment at a concentration corresponding to the compound's GI_{50} , and determined the relative G_1/G_2 -M ratio. Illustrative cell cycle profiles for two potent compounds (4v and 4u) along with lapatinib and CGP74514A as controls (EGFR and CDK inhibitors, respectively) are presented in

Fig. 3. As shown in this figure and **Table 2**, the most sensitive cell line EOL-1 entered G_1 cell cycle arrest (corresponding to a relative G_1/G_2 -M ratio above 1) upon treatment, in keeping with this line's dependence on the PDGFR α kinase. Importantly, we found that the compound's PDGFR α inhibiting activity correlated strongly with their relative G_1/G_2 -M ratios (Pearson coefficient = -0.73, **Fig. 2**). Unlike EOL-1, the other tested cell lines exhibited G_2 -M arrest. The different effects observed in these cell lines suggest that the compounds may target PDGFR α rather than CDK2 at equitoxic doses, but interact with other kinases if their primary target is absent.



Figure 3. Cell cycle measurements for EOL-1, HCC827 and K562 treated with **4u** and **4v** for 24 h. CGP74514A and lapatinib (CDK and EGFR inhibitor, respectively) were used as positive controls. The compounds were used at doses corresponding to their GI_{50} values.

Because **4e** showed some activity against the receptor kinase HER4, which is related to EGFR (preliminary screening, see **Supplementary data**), we were surprised that the HCC827 and K562 cell lines entered G_2 -M arrest when treated with this compound. We therefore expect that the compounds may preferentially target kinases other than receptor tyrosine kinases, potentially including CDKs. The weak correlation between cytotoxicity in HCC827 and CDK2 inhibition may support this hypothesis (Pearson coeff. = 0.55, **Fig. 2**). While no clear relationship between

cytotoxicity and CDK inhibition has been found, targeting CDK inhibition may at least partly contribute to the compounds' mechanism of antiproliferative activity.

2.3. Mechanism of cellular activity

The most sensitive cell line, EOL-1, bears an oncogenic activation of PDGFRA gene, which **is** consistent with our hypothesis that inhibition of this kinase is linked to the compounds' cellular activity. We therefore used immunoblotting to determine whether the compounds' cytotoxicity and the G₁ phase arrest relate to PDGFRα inhibition. Several compounds with various activity levels were applied to EOL-1 cells at two doses for 1 hour, after which the cells were harvested and analysed for cellular signaling downstream of PDGFRα. We immunoblotted the lysates for STAT3, ERK1/2, and MEK1/2 and their phosphoforms, which are known to be induced by PDGFRα signaling (**Fig. 4**). There were clear changes in the abundance of the phosphoforms of all three kinases. Two potent compounds, **4t** and **4o**, strongly suppressed the phosphorylation of STAT3 and ERK1/2 at both tested concentrations, whereas the less active **4j** and **4p** only reduced the abundance of these phosphoproteins at the higher concentration, and the least active compounds **4a** and **4b** did not affect these phosphoproteins at all. Phosphorylation of MEK1/2 at serines 217/221 decreased slightly only in cells treated with the most potent **4t** and **4o**. These observations correspond well with the kinase inhibition assay results.





In the next experiment, we treated EOL-1 cells for 1 hour with one of the most potent compounds, 4u, to confirm that its mechanism of action is specifically coupled to PDGFR α inhibition.

Immunoblotting revealed dose-dependent inhibition of PDGFRα autophosphorylation at tyrosines 754, 849 and 1018 (**Fig. 5a**). These tyrosines are autophosphorylated upon external stimulation by PDGF, but are constitutively phosphorylated independently of cytokine presence in EOL-1 due to the formation of the FIP1L1-PDGFRA fusion, which interrupts the juxtamembrane domain of PDGFRα [29]. Corresponding downregulations were also seen for the STAT3 and ERK1/2 phosphoforms. When the cells were treated for periods longer than 4 hours, they started to degrade FIP1L1-PDGFRα (data not shown), ceasing to proliferate and showing markers of apoptosis after 24 hours (**Fig. 5b**).



b

a

		EOL	1 / cmpd. 4u (µм)		
	0	0.008	0.04	0.2	1
008 000 000 000 000 000 000 000 000 000	subG1: 20.0% G1: 60.9% S: 20.7% G2/M: 18.4%	subG1: 27.9%	subG1: 36.5% G1: 86.1% S: 7.7% G2/M: 6.2%	subG1: 49.8% re G1: 86.3% ss S: 10.6% ss G2/M: 3.1% tr ss ss ss ss ss ss	subG1: 46.3% G1: 79.9% S: 14.5% G2/M: 5.6%

Fig. 5. Cellular effects of compound **4u** in EOL-1. (a) Inhibition of PDGFR α and its downstream signaling pathways after 1 h. (b) Cell cycle in EOL-1 cells treated for 24 hours.

3. Conclusion

A collection of 23 novel 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with nanomolar inhibitory activities against PDGFR α has been prepared. The compounds demonstrated strong and selective cytotoxicity in the human eosinophilic leukemia cell line EOL-1, which expresses the oncogenic kinase

FIP1L1-PDGFRA. Their cytotoxicity in EOL-1 correlated significantly with PDGFR α inhibition. Moreover, they exhibited dose-dependent inhibition of PDGFR α autophosphorylation and suppressed its downstream signaling pathways in treated cells, confirming the proposed cellular mechanism of action. Our results suggest that substituted purines are versatile platforms for preparing tyrosine kinase inhibitors with specific activity towards eosinophilic leukemia and other cancers expressing constitutively activated PDGFR α mutants such as hepatocellular carcinoma, gastrointestinal stromal tumors or melanoma [4, 5, 30].

4. Experimental section

4.1. Chemistry and general information

All microwave irradiation experiments were carried out in a dedicated CEM-Discover mono-mode microwave apparatus. The reactor was used in the standard configuration as delivered, including proprietary software. The reactions were carried out in 10 mL glass vials sealed with a silicone/PTFE top, which can be exposed to a maximum of 250 °C and 21 bar internal pressure. The temperature was measured with an IR sensor on the outer surface of the process vial. After the irradiation period, the reaction vessel was cooled to ambient temperature by gas jet cooling. Melting points were determined on Buchi Melting Point B-540 apparatus and were uncorrected. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Jeol 500 ECA instrument operating at 500 MHz for ¹H and 126 MHz for ¹³C at ambient temperature in DMSO- d_6 . Chemical shifts are reported in ppm. Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz), and the following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), doublet of doublet (dd), triplet (t), doublet of triplet (dt), quartet (q), quintet (qui), sextet (sex), nonet (n), multiplet (m). Mass spectra were recorded using an LCQ ion trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA). The chromatographic purity of the compounds was determined using HPLC-DAD-MS. An Alliance 2695 separations module (Waters) linked simultaneously to a PDA 996 (Waters) and a Q-Tof micro (Waters) benchtop quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer were used. Samples were dissolved in methanol and diluted to a concentration of 10 $\mu g \cdot m L^{-1}$ in the mobile phase (initial conditions). Then, 10 μL of the solution were injected on a RPcolumn (150 mm × 2.1 mm; 3.5 μm; Symmetry C18, Waters). The column was kept in a thermostat at 25 °C. Solvent (A) consisted of 15 mM formic acid adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide. Methanol was used as the organic modifier (solvent B). At flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, the following binary gradient was used: 0 min, 10% B; 0–24 min, a linear gradient to 90% B, followed by 10 min isocratic elution of 90% B. At the end of the gradient, the column was re-equilibrated to the initial conditions for 10 min. The effluent was introduced into the DAD (scanning range 210-400 nm, with 1.2 nm resolution) and an electrospray source was applied (source temperature 110 °C, capillary voltage +3.0 kV, cone voltage +20 V, desolvation temperature 250 °C). Nitrogen was used as both the

desolvation gas (500 L·h⁻¹) and the cone gas (50 L·h⁻¹). The mass spectrometer was operated in positive (ESI+) ionization mode, and data were acquired in the 50–1000 m/z range. Elemental analyses were performed using an EA1112 CHN analyser (Thermo Finnigan); the results obtained for C, H, and N were within acceptable limits of the expected values. Merck silica gel Kieselgel 60 (230–400 mesh) was used for column chromatography. The purity of biologically evaluated compounds was >95% as determined by HPLC-DAD-MS and elemental analysis.

4.2. Protocol for preparation of compounds 2a-2h

2,6-Dichloro-9*H*-purine (15.8 mmol), an appropriate alcohol (31.7 mmol), and triphenylphosphine (19.0 mmol) were dissolved in dry tetrahydrofuran (100 mL) and cooled to 0 °C. Diisopropyl azodicarboxylate (19.0 mmol) was added dropwise to the stirred solution under an argon atmosphere, and the temperature was kept between 0 and 20 °C. The reaction mixture was stirred under an argon atmosphere at 20 °C for a further 2-4 h. The reaction was monitored by TLC until completion. The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure, and the residue was dissolved in boiling toluene (100 mL). After cooling to room temperature, the solution was inoculated with a small amount of triphenylphosphine oxide and the solution was kept at 4 °C for 24 h. The triphenylphosphine oxide was then filtered off and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue was crystallized from ethanol or purified by column chromatography on silica (petroleum ether: ethyl acetate, 2:1) to afford the pure product.

4.2.1. 9-Butyl-2,6-dichloro-9H-purine (2a)

Yield: 86 %; M.p. = 79-80 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.71 (s, 1H), 4.22 (t, J = 7.0, 2H), 1.85 – 1.70 (m, 2H), 1.32 – 1.16 (m, 2H), 0.85 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 153.89, 151.34, 150.00, 148.84, 130.88, 44.25, 31.43, 19.72, 13.81. HPLC-MS (ESI+): 245.13 (99.8%). Elemental analysis Calcd. for C₉H₁₀Cl₂N₄ (245.11): C, 44.10; H, 4.11; N, 22.86. Found: C, 43.97; H, 4.05; N, 22.53.

4.2.2. 2,6-Dichloro-9-isopentyl-9H-purine (2b)

Yield: 83%; M.p. = 80-81 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.73 (s, 1H), 4.22 (t, J = 7.5, 2H), 1.70 (q, J = 7.1, 2H), 1.44 (n, J = 6.5, 1H), 0.88 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 156.68, 153.93, 151.33, 148.95, 130.93, 42.91, 38.14, 25.57, 22.57. HPLC-MS (ESI+): 259.32 (99.8%). Elemental analysis Calcd. for C₁₀H₁₂Cl₂N₄ (259.14): C, 46.35; H, 4.67; N, 21.62. Found: C, 46.02; H, 4.58; N, 21.39.

4.2.3. 2,6-dichloro-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-purine (2c)

Yield: 96%; M.p. = 95-96 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.66 (s, 1H), 4.80 (d, *J* = 7.2, 2H), 1.76 (t, *J* = 7.2, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.68 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 153.71, 151.41, 149.97, 148.68, 138.97, 131.03, 118.34, 42.36, 25.89, 18.42. HPLC-MS (ESI+): 257.63 (96.50 %).

Elemental analysis Calcd. for $C_{10}H_{10}Cl_2N_4$ (257.12): C, 46.71; H, 3.92; N, 21.79. Found: C, 46.59; H, 3.95; N, 21.63.

4.2.4. 2,6-dichloro-9-hexyl-9H-purine (2d)

Yield: 75%; M.p. = 82-84 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.70 (s, 1H), 4.19 (t, J = 7.2, 2H), 1.78 (qui, J = 7.2, 2H), 1.27 – 0.91 (m, 6H), 0.76 (t, J = 7.1, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 156.69, 153.99, 151.35, 149.03, 130.97, 44.49, 31.09, 29.29, 26.05, 22.44, 14.34. HPLC-MS (ESI+): 273.19 (99.8 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₁H₁₄Cl₂N₄ (273.16): C, 48.37; H, 5.17; N, 20.51. Found: C, 48.21; H, 4.96; N, 20.33.

4.2.5. 2,6-dichloro-9-cyclohexyl-9H-purine (2e)

Yield: 79%; M.p. = 111-112 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.82 (s, 1H), 4.41 (qui, J = 6.3, 1H), 2.04 – 1.95 (m, 2H), 1.93 – 1.77 (m, 4H), 1.69-1.65 (m, 1H), 1.49 – 1.35 (m, 2H), 1.30 – 1.16 (m, 1H). HPLC-MS (ESI+): 271.17 (99.7 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₁H₁₂Cl₂N₄ (271.15): C, 48.73; H, 4.46; N, 20.66. Found: C, 48.67; H, 4.39; N, 20.44.

4.2.6. 2,6-dichloro-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purine (2f)

Yield: 91%; M.p. = 121-123 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.77 (s, 1H), 7.28 (d, J = 8.5, 2H), 6.86 (d, J = 8.5, 2H), 5.36 (s, 2H), 3.67 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.63, 153.75, 151.60, 150.25, 148.78, 131.01, 129.90, 128.02, 114.66, 60.16, 47.05. HPLC-MS (ESI+): 309.74 (95.4 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₃H₁₀Cl₂N₄O (309.15): C, 50.51; H, 3.26; N, 18.12. Found: C, 50.42; H, 3.35; N, 18.03.

4.2.7. (E)-2,6-dichloro-9-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-9H-purine (2g)

Yield: 51 %; M.p.= 101-102 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.21 (s, 1H), 5.22 (t, J = 6.8, 1H), 4.99 – 4.86 (m, 3H), 2.05 – 1.87 (m, 4H), 1.78 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.45 (s, 3H). HPLC-MS (ESI+): 325.22 (96.20 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₅H₁₈Cl₂N₄ (325.24): C, 55.39; H, 5.58; N, 17.23 Found: C, 55.32; H, 5.60; N, 17.21.

4.2.8. 9-benzyl-2,6-dichloro-9H-purine (2h)

Yield: 93%; M.p. = 148-149 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.81 (s, 1H), 7.39 – 7.16 (m, 5H), 5.45 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 153.90, 151.66, 150.33, 148.95, 136.16, 131.01, 129.34, 128.63, 128.14, 47.64. HPLC-MS (ESI+): 279.72 (99.8%). Elemental analysis Calcd. for C₁₂H₈Cl₂N₄ (279.12): C, 51.64; H, 2.89; N, 20.07. Found: C, 51.56; H, 2.95; N, 19.90.

4.3. Protocol for preparation of compounds 3a-3w

To a suspension of 9-substituted-2,6-dichloro-9*H*-purine (6.25 mmol) in a mixture of *n*-propanol (40 mL) and *N*,*N*-diisopropyl-*N*-ethylamine (18.75 mmol), the appropriate amine or benzylamine (7.5 mmol) was added. The suspension was heated with stirring in a sealed tube under an argon atmosphere at 120 °C until completion of the reaction was indicated by TLC. After cooling to room

temperature, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was partitioned between water (50 mL) and dichloromethane (50 mL). In addition, the water phase was extracted with dichloromethane (2 x 30 mL). The combined organic phases were washed with water (30 mL) and brine (30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and evaporated under reduced pressure. If necessary, the crude product was purified by column chromatography on silica (petroleum ether: ethyl acetate, 2:1).

4.3.1. 9-butyl-2-chloro-N-(3-chlorobenzyl)-9H-purin-6-amine (3a)

Yield: 61 %; M.p. = 120-123 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.79 (t, J = 5.9, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.32 – 7.21 (m, 3H), 4.59 (d, J = 6.0, 2H), 4.05 (t, J = 7.0, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.23 – 1.13 (m, 2H), 0.82 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 155.29, 153.41, 150.55, 142.41, 142.15, 133.43, 130.72, 127.69, 127.32, 126.55, 118.65, 43.34, 43.16, 31.82, 19.72, 13.87. HPLC-MS (ESI+): 350.82 (99.98 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₇Cl₂N₅ (350.25): C, 55.19; H, 4.34; N, 20.11. Found: C, 55.02; H, 4.38; N, 19.98.

4.3.2. 2-chloro-N-(3-chlorobenzyl)-9-isopentyl-9H-purin-6-amine (3b)

Yield: 63 %; M.p. = 120-121 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.80 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.48 – 7.13 (m, 4H), 4.69 – 4.51 (s (br), 2H), 4.08 (t, J = 6.5, 2H), 1.63 (q, J = 6.5, 2H), 1.42 (n, J = 6.5, 1H), 0.85 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 155.30, 153.40, 150.53, 142.50, 142.10, 133.47, 130.69, 127.73, 127.34, 126.54, 118.70, 43.18, 42.05, 38.63, 25.58, 22.63. HPLC-MS (ESI+): 364.80 (99.53 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₁₉Cl₂N₅ (364.27): C, 56.05; H, 5.26; N, 19.23. Found: C, 56.18; H, 5.23; N, 19.24.

4.3.3. 2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purin-6-amine (3c)

Yield: 71 %; M.p. = 115-117 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.47 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.01 (t, J = 2.5, 1H), 7.79 (d, J = 8.5, 1H), 7.34 (t, J = 8.0, 1H), 7.27 (d, J = 8.5, 2H), 7.10 (d, J = 7.5, 1H), 6.88 (d, J = 8.5, 2H), 5.29 (s, 2H), 3.68 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.50, 152.75, 152.62, 151.38, 143.12, 140.97, 133.37, 130.70, 129.72, 128.88, 123.44, 120.85, 119.85, 114.72, 55.62. Elemental analysis Calcd. for C₁₉H₁₅Cl₂N₅O (400.26): C, 57.01; H, 3.78; N, 17.50. Found: C, 57.06; H, 3.84; N, 17.17. HPLC-MS (ESI+): 400.71 (95.10 %).

4.3.4. 9-benzyl-2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9H-purin-6-amine (3d)

Yield: 65 %; M.p. = 124-125 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.49 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.79 (d, J = 8.1, 1H), 7.42 – 7.21 (m, 6H), 7.09 (d, J = 7.7, 1H), 5.37 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 154.92, 154.57, 153.24, 144.13, 140.79, 137.47, 134.43, 130.17, 128.68, 128.48, 127.74, 122.58, 122.54, 120.89, 120.18, 48.86. HPLC-MS (ESI+): 370.76 (96.26 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₈H₁₃Cl₂N₅ (370.24): C, 58.39; H, 3.54; N, 18.92. Found: C, 58.23, H, 3.59, N, 18.73.

4.3.5. (E)-2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-9H-purin-6-amine (3e)
Yield: 73 %; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 10.44 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.02 (t, *J* = 1.5, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.34 (t, *J* = 8.5, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.5, 1H), 5.37 (t, *J* = 6.0, 1H), 4.97 (t, *J* = 6.0, 1H), 4.73 (d, *J* = 7.0, 2H), 2.07 – 1.97 (m, 4H), 1.76 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.48 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 152.54, 151.30, 142.80, 141.53, 141.04, 133.37, 131.59, 130.72, 124.23, 123.39, 120.77, 119.77, 119.48, 118.95, 41.56, 39.31, 26.16, 25.94, 18.05, 16.68. HPLC-MS (ESI+): 416.14 (93.30 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₁H₂₃Cl₂N₅ (416.35): C, 60.58; H, 5.57; N, 16.82. Found: C, 60.51; H, 5.63; N, 16.77.

4.3.6. 2-chloro-N-(2,4-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purin-6-amine (3f)

Yield: 71 %; M.p. = 144-145 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.01 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.1, 1H), 6.64 (d, *J* = 2.6, 1H), 6.53 (dd, *J* = 8.7, *J*' = 2.6, 1H), 4.11 (t, *J* = 7.4, 2H), 3.75 (d, *J* = 4.3, 6H), 1.66 (q, *J* = 7.0, 2H), 1.45 (n, *J* = 6.5, 1H), 0.88 (d, *J* = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO -*d*₆) δ (ppm): 158.53, 153.14, 153.08, 142.55, 129.29, 120.23, 118.95, 104.94, 99.70, 56.31, 55.89, 42.11, 38.60, 25.62, 22.66. HPLC-MS (ESI+): 376.43 (99.98 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₈H₂₂ClN₅O₂ (375.15): C, 57.52; H, 5.90; N, 18.63. Found: C, 57.38; H, 5.72; N, 18.58.

4.3.7. 9-butyl-2-chloro-N-(3,5-dimethoxyphenyl)-9H-purin-6-amine (3g)

Yield: 80 %; M.p. = 100-102 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.18 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.20 (d, J = 2.1, 2H), 6.22 (t, J = 2.2, 1H), 4.12 (qui, J = 6.5, 2H), 3.70 (s, 6H), 1.75 (qui, J = 7.0, 2H), 1.22 (sex, J = 7.0, 2H), 0.87 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.84, 155.29, 153.57, 152.71, 143.05, 141.09, 119.42, 99.82, 95.53, 55.57, 43.52, 31.77, 19.75, 13.90. HPLC-MS (ESI+): 362.32 (96.69 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₂₀ClN₅O₂ (361.83): C, 56.43; H, 5.57; N, 19.36. Found: C: 56.36; H: 5.59; N: 19.17.

4.3.8. 2-chloro-N-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-hexyl-9H-purin-6-amine (3h)

Yield: 54 %; M.p. = 90-101 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.16 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.20 (d, J = 2.2, 2H), 6.22 (t, J = 2.2, 1H), 4.10 (t, J = 7.1, 2H), 3.70 (s, 6H), 1.76 (qui, J = 6.5, 2H), 1.29 – 1.14 (m, 6H), 0.84 – 0.74 (t, J = 7.0, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.81, 152.69, 152.52, 151.32, 143.00, 141.11, 119.41, 99.79, 95.53, 55.56, 43.77, 31.11, 29.67, 26.10, 22.46, 14.35. HPLC-MS (ESI+): 390.79 (98.27 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₉H₂₄ClN₅O₂ (389.88): C, 58.53; H, 6.20; N, 17.96. Found: C, 56.77; H, 6.18; N, 16.79.

4.3.9. 4-((2-chloro-9-cyclohexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (3i)

Yield: 58 %; M.p. = 156-157 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.97 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.5, 2H), 6.71 (d, J = 8.5, 2H), 4.28 (qui, J = 6.6, 1H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.86-1.79 (m, 4H), 1.67-1.65 (m, 1H), 1.48 – 1.32 (m, 2H), 1.26 – 1.15 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 154.45, 153.23, 152.78, 150.47, 140.53, 130.59, 124.10, 119.09, 115.47, 54.25, 32.84, 25.55, 25.27. HPLC-MS (ESI+): 344.59 (95.16 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₁₈ClN₅O (343.82): C, 59.39; H, 5.28; N, 20.37. Found: C, 59.76; H, 5.42; N, 20.16.

4.3.10. 2-chloro-N-(4-chlorophenyl)-9-cyclohexyl-9H-purin-6-amine (3j)

Yield: 59 %. M.p. = 134-136 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 10.39 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.0, 2H), 7.38 (d, *J* = 7.0, 2H), 4.38 – 4.27 (m, 1H), 1.98 (d, *J* = 8.3, 2H), 1.91 – 1.77 (m, 4H), 1.67 (d, *J* = 8.3, 1H), 1.50 – 1.36 (m, 2H), 1.30 – 1.16 (m, 2H).¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.67, 152.39, 150.88, 141.31, 138.42, 128.95, 127.56, 123.10, 119.53, 54.39, 32.81, 25.54, 25.27. HPLC-MS (ESI+): 362.38 (95.45 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₁₇Cl₂N₅ (362.26): C, 56.37; H, 4.73; N, 19.33. Found: C, 56. 20; H, 4.79; N, 19.28.

4.3.11. 4-((2-chloro-9-hexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (3k)

Yield: 63 %; M.p. = 195-196 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.96 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.70 (d, J = 8.0, 2H), 4.08 (t, J = 7.5, 2H), 1.76 (qui, J = 6.5, 2H), 1.15-1.30 (m, 6H), 0.79 (t, J = 6.9, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 154.43, 153.16, 152.98, 150.98, 142.43, 130.56, 124.04, 118.93, 115.47, 43.68, 31.12, 29.71, 26.10, 22.47, 14.37. HPLC-MS (ESI+): 346.42 (95.72 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₂₀ClN₅O (345.83): C, 59.04; H, 5.83; N, 20.25. Found: C, 58.78; H, 5.79; N, 20.03.

4.3.12. 2-chloro-N-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purin-6-amine (31)

Yield: 68 %; M.p. = 103-104 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.18 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.20 (d, J = 2.2, 2H), 6.22 (t, J = 2.2, 1H), 4.13 (t, J = 7.0, 2H), 3.70 (s, 6H), 1.69 (q, J = 7.0, 2H), 1.46 (n, J = 6.6, 1H), 0.89 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.82, 152.70, 152.52, 151.31, 142.98, 141.10, 119.41, 99.72, 95.50, 55.56, 42.19, 38.56, 25.62, 22.65. HPLC-MS (ESI+): 376.32 (97.14 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₈H₂₂ClN₅O₂ (375.86): C, 57.52; H, 5.90; N, 18.63. Found: C, 57.21; H, 5.98; N, 18.50.

4.3.13. 2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purin-6-amine (3m)

Yield: 78 %; M.p. = 108-110 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.48 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.02 (t, J = 2.5, 1H), 7.80 (d, J = 8.5, 1H), 7.35 (t, J = 8.0, 1H), 7.08 (d, J = 8.0, 1H), 4.12 (t, J = 7.0, 2H), 1.78 (qui, J = 6.5 2H), 1.25-1.18 (m, 6H), 0.80 (t, J = 6.9, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.78, 152.25, 151.33, 143.12, 140.90, 133.40, 130.75, 123.49, 120.71, 119.71, 118.59, 44.01, 31.11, 29.58, 26.06, 22.46, 14.36. HPLC-MS (ESI+): 364.48 (96.99 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₁₉Cl₂N₅ (364.27): C, 56.05; H, 5.26; N, 19.23. Found: C, 55.88; H, 5.14; N, 18.97.

4.3.14. 2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-purin-6-amine (3n)

Yield: 72 %; M.p. = 115-116 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.43 (s, J = 6.2, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.01 (t, J = 2.1, 1H), 7.79 (dd, J = 8.5, J' = 2.1, 1H), 7.33 (t, J = 8.5, 1H), 7.08 (dd, J = 8.5, J' = 2.1, 1H), 5.38-5.34 (m, 1H), 4.71 (d, J = 7.2, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.68 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.53, 151.23, 142.83, 140.98, 138.22, 133.35, 130.68, 123.36, 120.74, 119.74, 119.43, 119.05, 41.60, 25.81, 18.44. HPLC-MS (ESI+): 348.30 (97.37 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₅Cl₂N₅ (348.22): C, 55.19; H, 4.34; N, 20.11. Found: C, 55.02; H, 4.38; N, 19.98.

4.3.15. 9-butyl-2-chloro-N-phenyl-9H-purin-6-amine (30)

Yield: 83 %; M.p. = 133-134 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 10.25 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.0, 2H), 7.06 (t, *J* = 7.5, 1H), 4.13 (t, *J* = 7.0, 2H), 1.76 (qui, *J* = 7.0, 2H), 1.24 (sep, *J* = 7.0, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 152.89, 152.74, 151.34, 142.92, 139.36, 129.05, 123.95, 121.74, 119.31, 43.51, 31.79, 19.76, 13.91. HPLC-MS(ESI+): 302.31 (98.58 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₅H₁₆ClN₅ (301.78): C, 59.70; H, 5.34; N, 23.21. Found: C, 59.51; H, 5.12; N, 23.14.

4.3.16. 2-chloro-N-(4-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purin-6-amine (3p)

Yield: 84 %; M.p. = 149-151 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.38 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.85 (d, J = 9.0, 2H), 7.37 (d, J = 9.0, 2H), 4.12 (t, J = 7.0, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.29 – 1.17 (m, 6H), 0.80 (t, J = 6.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 156.55, 152.62, 151.45, 143.18, 138.44, 128.95, 127.56, 123.08, 119.38, 43.79, 31.11, 29.67, 26.09, 22.46, 14.36. HPLC-MS (ESI+): 364.61 (99.49 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₇H₁₉Cl₂N₅ (364.27): C, 56.05; H, 5.26; N, 19.23. Found: C, 55.85; H, 5.41; N, 19.49.

4.3.17. 9-butyl-2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9H-purin-6-amine (3q)

Yield: 84 %; M.p. = 106-107 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.44 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.02 (d, J = 1.7, 1H), 7.81 (d, J = 8.5, 1H), 7.35 (t, J = 8.0, 1H), 7.09 (t, J = 8.0, 1H), 4.13 (t, J = 7.1, 2H), 1.81 – 1.72 (m, 2H), 1.29 – 1.18 (m, 2H), 0.86 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.56, 152.50, 151.55, 143.31, 141.03, 133.36, 130.65, 123.37, 120.79, 119.79, 119.48, 43.57, 31.77, 19.76, 13.90. HPLC-MS (ESI+): 336.20 (98.57 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₅H₁₅Cl₂N₅ (336.22): C, 53.59; H, 4.50; N, 20.83. Found: C, 53.84; H, 4.75; N, 21.09.

4.3.18. 4-((2-chloro-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (3r)

Yield: 61 %; M.p. = 234-235 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.97 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.5, 2H), 6.71 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.11 (t, J = 7.3, 2H), 1.68 (q, J = 7.0, 2H), 1.44 (non, J = 6.6, 1H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 154.43, 153.16, 152.98, 142.34, 130.61, 124.07, 118.96, 115.48, 42.10, 38.61, 25.62, 22.66. HPLC-MS (ESI+): 332.59 (95.45 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₈ClN₅O (331.80): C, 57.92; H, 5.47; N, 21.11. Found: C, 57.70; H, 5.48; N, 20.80.

4.3.19. 2-chloro-9-isopentyl-N-phenyl-9H-purin-6-amine (3s)

Yield: 60 %; M.p. = 124-126 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.26 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.80 (d, J = 7.7, 2H), 7.32 (t, J = 7.5, 2H), 7.06 (t, J = 7.5, 1H), 4.14 (t, J = 7.4, 2H), 1.68 (q, J = 7.0, 2H), 1.47 (n, J = 6.5, 1H), 0.89 (d, J = 6.5, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.90, 152.73, 151.32, 142.88, 139.35, 129.06, 123.96, 121.75, 119.29, 42.18, 38.58, 25.63, 22.67. HPLC-MS (ESI+): 316.26 (98.37 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₈ClN₅ (315.80): C, 60.85; H, 5.75; N, 22.18. Found: C, 60.25; H, 5.79; N, 21.86.

4.3.20. 3-((2-chloro-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (3t)

Yield: 84 %; M.p. = 156-157 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.11 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.30 (t, J = 1.5, 1H), 7.22 (d, J = 8.1, 1H), 7.07 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.47 (dd, J = 8.1, J'=2.3, 1H), 4.13 (t, J = 7.0, 2H), 1.68 (q, J = 7.0, 2H), 1.47 (n, J = 6.0, 1H), 0.88 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 157.97, 152.80, 151.19, 142.74, 140.32, 129.64, 119.11, 113.70, 112.60, 111.18, 108.89, 42.22, 38.56, 25.63, 22.67. Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₈ClN₅O (331.12): C, 57.92; H, 5.47; N, 21.11. Found: C, 57.87; H, 5.50; N, 21.09. HPLC-MS (ESI+): 332.30 (99.16 %).

4.3.21. 2-chloro-N-(3-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purin-6-amine (3u)

Yield: 81 %; M.p. = 86-88 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.43 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.01 (t, J = 2.0, 1H), 7.79 (dd, J = 8.5, J' = 2.0, 1H), 7.34 (t, J = 8.1, 1H), 7.12 – 7.05 (m, 1H), 4.14 (t, J = 6.5, 2H), 1.68 (q, J = 6.5, 2H), 1.46 (n, J = 7.0, 1H), 0.88 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.55, 152.49, 151.52, 143.25, 141.02, 133.36, 130.68, 123.37, 120.79, 119.79, 119.46, 42.24, 38.55, 25.63, 22.66. HPLC-MS (ESI+): 350.39 (97.85 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₇Cl₂N₅ (350.25): C, 54.87; H, 4.89; N, 20.00. Found: C, 54.94; H, 4.99; N, 20.13.

4.3.22. 9-butyl-2-chloro-N-(4-chlorophenyl)-9H-purin-6-amine (3v)

Yield: 94 %; M.p. = 156-157 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.38 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.5, 2H), 7.37 (d, J = 8.5, 2H), 4.12 (t, J = 7.1, 2H), 1.75 (qui, J = 7.0, 2H), 1.22 (sex, J = 7.0, 2H), 0.85 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.63, 152.54, 151.43, 143.23, 138.40, 128.91, 127.55, 122.98, 119.36, 43.54, 31.58, 19.69, 13.96. HPLC-MS (ESI+): 336.50 (95.66 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₅H₁₅Cl₂N₅ (336.22): C, 53.59; H, 4.50; N, 20.83. Found: C, 53.45; H, 4.41; N, 20.78.

4.3.23. 2-chloro-N-(4-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purin-6-amine (3w)

Yield: 81 %; M.p. = 156-158 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.39 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.84 (d, J = 8.5, 2H), 7.36 (d, J = 8.5, 2H), 4.15 (t, J = 7.25, 2H), 1.68 (q, J = 6.5, 2H), 1.46 (n, J = 6.6, 1H), 0.89 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 152.62, 151.43, 143.10, 138.41, 128.94, 127.55, 123.07, 119.36, 42.20, 38.55, 25.61, 22.65. HPLC-MS (ESI+): 350.46 (95.99 %). Elemental analysis Calcd. for C₁₆H₁₇Cl₂N₅ (350.25): C, 54.87; H, 4.89; N, 20.00. Found: C, 54.68; H, 4.74; N, 19.94.

4.4. Protocol for preparation of compounds 4a-4w

A 2-chloro-6,9-disubstituted-9*H*-purine (5.0 mmol) and *trans*-1,4-diaminocyclohexane (75.0 mmol) were mixed in *n*-butanol. The reaction mixture was heated in a sealed vial with a Teflon septum using a CEM Discover reactor at 140-170 °C for 0.5-1.5 h (controlled by TLC - chloroform: methanol, 9:1; see **Supplementary data**) or in a sealed tube under an argon atmosphere at 160 °C for 4-10 h. After cooling to room temperature, water (50 mL) was added to the reaction mixture and the resulting suspension was extracted three times with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic phases

were washed with water (50 mL) and brine (50 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica (chloroform: methanol, 19:1 > 4:1) to yield the final compound.

4.4.1. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N⁶-(3-chlorobenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4a)

Yield: 78 %; M.p. = 149-150 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.87 (s(br), 1H), 7.66 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 2H), 7.24 – 7.20 (m, 1H), 6.10 (s(br), 1H), 4.60 – 4.46 (m, 2H), 3.89 (t, J = 5.9, 2H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 2.63-2.60 (m, 1H), 1.88 – 1.61 (m, 4H), 1.60-1.57 (m, 2H), 1.45 – 1.40 (m, 1H), 1.20 – 1.14 (m, 5H), 0.89 – 0.80 (m, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.10, 154.78, 144.09, 137.88, 133.29, 130.49, 127.50, 126.91, 126.49, 50.07, 49.87, 33.58, 31.82, 31.43, 29.55, 25.52, 22.73. HPLC-MS (ESI+): 428.23 (99.45 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₃₀ClN₇ (427.98): C, 61.74; H, 7.07; N, 22.91. Found: C, 61.55; H, 7.31; N, 22.73.

4.4.2. N²-(4-aminocyclohexyl)-N⁶-(3-chlorobenzyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4b)

Yield: 67 %; M.p. = 94-96 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.68 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.31-7.18 (m, 3H), 6.10 (s(br), 1H), 4.54 (s(br), 2H), 3.99-3.87 (m, 2H), 1.90-1.69 (m, 3H), 1.67-1.55 (m, 2H), 1.43 (non, J = 6.5, 1H), 1.28-1.07 (m, 6H), 0.85 (d, J = 6.5, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.04, 154.76, 144.07, 138.02, 137.82, 133.30, 130.49, 127.50, 126.90, 126.48, 50.06, 49.86, 41.13, 38.85, 33.57, 31.82, 31.42, 29.54, 25.51, 22.72. HPLC-MS (ESI+): 442.17 (97.30 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₂ClN₇ (442.01): C, 62.50; H, 7.30; N, 22.18. Found: C, 62.35; H, 7.41; N, 22.11.

4.4.3. *N*²-(4-aminocyclohexyl)-*N*⁶-(3-chlorophenyl)-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4c) Yield: 71 %; M.p. = 125-126 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 7.88 (s(br), 1H), 7.65 (s, 1H), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 4H), 7.22-7.19 (m, 2H), 6.08 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.58-3.48 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.72-1.62 (m, 4H), 1.16-1.00 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 159.27, 158.92, 152.27, 142.51, 133.30, 130.34, 129.79, 121.68, 119.60, 118.70, 114.47, 114.13, 65.50, 56.60, 55.63, 50.07, 33.59, 31.47, 24.08, 19.10, 15.63. HPLC-MS (ESI+): 478.54 (99.99 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₅H₂₈ClN₇O (478.00): C, 62.82; H, 5.90; N, 20.51. Found: C, 62.66; H, 6.01; N, 20.64.

4.4.4. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-benzyl-N⁶-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4d)

Yield: 65 %; M.p. = 110-111 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.67 (s(br), 1H), 8.30 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.42 – 7.17 (m, 6H), 6.97 (d, J = 7.5, 1H), 6.56 (t, J = 6.75, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 1H), 1.93 – 1.86 (m, 2H), 1.80-1.71 (m, 2H), 1.26 – 1.13 (m, 5H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.02, 152.28, 142.49, 138.95, 137.85, 133.27, 130.35, 129.12, 128.13, 127.61, 121.71, 119.59, 118.69, 114.01, 50.52, 35.69, 32.36, 31.83. HPLC-MS (ESI+): 448.68 (99.99 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₄H₂₆ClN₇ (447.97): C, 64.35; H, 5.85; N, 21.89. Found: C, 64.15; H, 5.99; N, 21.81.

4.4.5. (E)- N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(3-chlorophenyl)-9-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-9H-purine-2,6-diamine (4e)

Yield: 49 %; M.p. = 142-144 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.61 (s(br), 1H), 8.29 (s(br), 1H), 7.77 (s, 1H), 7.24 (t, *J* = 8.0, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.6, 1H), 6.61 – 6.48 (m, 1H), 5.33 (t, *J* = 6.6, 1H), 4.99 (t, *J* = 6.2, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.71-3.60 (m, 1H), 2.68-2.56 (m, 1H), 2.06 – 1.90 (m, 6H), 1.86 – 1.71 (m, 5H), 1.55 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.35 – 1.16 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 158.82, 152.22, 142.57, 140.34, 138.43, 133.28, 131.56, 130.34, 124.26, 121.62, 119.79, 119.53, 118.65, 114.14, 50.26, 34.41, 31.62, 26.25, 25.98, 18.06, 16.63. HPLC-MS (ESI+): 493.89 (98.60 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₇H₃₆ClN₇ (494.08): C, 65.64; H, 7.34; N, 19.84. Found: C, 65.60; H, 7.36; N, 19.79.

4.4.6. N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(2,4-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4f)

Yield: 52 %; M.p. = 108-109 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 8.40 (d, *J* = 8.8, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.63 (d, *J* = 2.3, 1H), 6.45 (d, *J* = 8.8, 2H), 3.97 (t, *J* = 6.5, 2H), 3.89-3.82 (m, 3H), 3.75-3.70 (m, 3H), 3.57 (d, *J* = 8.3, 1H), 1.94-1.90 (m, 2H), 1.79-1.75 (m, 2H), 1.63 (d, *J* = 6.7, 2H), 1.44 (t, *J* = 6.6, 1H), 1.32 – 1.04 (m, 4H), 0.87 (d, *J* = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d₆*) δ (ppm): 158.99, 158.21, 155.75, 152.19, 150.22, 138.71, 122.44, 113.87, 112.79, 104.62, 99.07, 56.48, 55.86, 50.36, 41.31, 38.80, 35.00, 31.58, 25.50, 22.70. HPLC-MS (ESI+): 454.00 (98.30 %). Elemental analysis Calcd. for $C_{24}H_{35}N_7O_2$ (453.59): C, 63.55; H, 7.78; N, 21.62. Found: C, 63.45; H, 7.85; N, 21.56.

4.4.7. N^2 -(4-aminocyclohexyl)-9-butyl- N^6 -(3,5-dimethoxyphenyl)-9H-purine-2,6-diamine(4g)

Yield: 72 %; M.p. = 87-88 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.20 (s (br), 1H), 7.79 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 2.0, 2H), 6.39 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.95 (t, *J* = 6.6, 2H), 3.69 (s, 6H), 2.55 – 2.47 (m, 1H), 1.89 (d, *J* = 10.9, 2H), 1.77-1.68 (m, 4H), 1.30 – 1.16 (m,4H), 1.14-1.07 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 160.81, 158.92, 152.51, 142.44, 138.74, 116.85, 114.17, 99.05, 94.11, 55.58, 50.41, 50.28, 42.56, 35.44, 31.82, 19.77, 13.93. HPLC-MS (ESI+): 440.00 (99.37 %). Elemental analysis Calcd. for $C_{23}H_{33}N_7O_2$ (439.56): C, 62.85; H, 7.57; N, 22.31. Found: C, 62.59; H, 7.69; N, 22.26.

4.4.8. N²-(4-aminocyclohexyl)-N⁶-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4h)

Yield: 69 %; M.p. = 108-110 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.19 (s(br), 1H), 7.78 (s, 1H), 7.25 (d, *J* = 1.8, 2H), 6.38 (s, 1H), 6.12-6.09 (m, 1H), 3.95 (t, *J* = 7.0, 2H), 3.68 (s, 6H), , 1.90-1.88 (m, 2H), 1.71-1.68 (m, 4H), 1.32 – 1.17 (m, 9H), 1.15-1.04 (m, 1H), 0.79 (t, *J* = 6.7, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 160.81, 158.96, 152.50, 142.45, 138.75, 114.20, 99.06, 94.08, 55.59, 50.46, 50.29, 42.91, 35.58, 31.86, 31.18, 29.67, 26.19, 22.47, 14.40. HPLC-MS (ESI+): 468.10 (97.78 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₅H₃₇N₇O₂ (467.62): C, 64.21; H, 7.98; N, 20.97. Found: C, 64.19; H, 8.05; N, 20.83.

4.4.9. 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-cyclohexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4i)

Yield: 57 %; M.p. = 137-138 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.06 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.8, 2H), 6.63 (dd, J = 8.8, J'= 3.5, 2H), 6.31 (s, 1H), 4.15 – 4.03 (m, 1H), 3.58 – 3.50 (m, 1H), 2.53 (t, J = 6.5, 1H), 1.98 – 1.87 (m, 4H), 1.82 – 1.75 (m, 4H), 1.64 (d, J = 12.4, 1H), 1.55 (d, J = 10.3,

1H), 1.40 – 1.27 (m, 3H), 1.26 – 1.05 (m, 5H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 164.00, 158.72, 152.88, 152.52, 151.72, 136.13, 132.57, 122.22, 115.15, 58.85, 50.46, 35.31, 33.07, 32.77, 31.75, 25.80, 25.41, 18.16. HPLC-MS (ESI+): 422.82 (99.40 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₁N₇O (421.55): C, 65.53; H, 7.41; N, 23.26. Found: C, 65.49; H, 7.45; N, 23.25.

4.4.10. N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(4-chlorophenyl)-9-cyclohexyl-9H-purine-2,6-diamine (4j)

Yield: 73 %; M.p. = 118-120 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.57 (s(br), 1H), 8.05 (d, J = 8.6, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.3, 2H), 6.52 (s, 1H), 4.13 (t, J = 6.5, 1H), 3.62 – 3.51 (m, 1H), 1.98 – 1.88 (m, 4H), 1.86 – 1.75 (m, 4H), 1.69 – 1.62 (m, 1H)1.60 – 1.58 (m, 3H), 1.41 – 1.06 (m, 6H).¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.62, 152.24, 140.13, 136.89, 128.51, 125.57, 121.89, 121.78, 58.87, 50.48, 35.35, 32.71, 31.73, 31.23, 25.80, 25.42. HPLC-MS (ESI+): 439.90 (99.05 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₀ClN₇ (439.99): C, 62.79; H, 6.87; N, 22.28. Found: C, 62.64; H, 7.01; N, 22.23.

4.4.11. 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-hexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4k)

Yield: 40 %; M.p. = 151-153 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.54 (s(br), 1H), 8.05 (d, J = 8.9, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.9, 2H), 6.51 (s(br), 1H), 3.95 (t, J = 6.1, 1H), 3.64 – 3.52 (m, 2H), 2.54 – 2.48 (m, 1H), 1.92 (d, J = 10.5, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 4H), 1.29 – 1.12 (m, 10H), 0.80 (t, J = 6.8, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.82, 152.21, 140.13, 128.92, 128.67, 128.37, 128.10, 125.55, 121.79, 114.06, 50.61, 42.93, 35.81, 31.84, 31.17, 29.66, 26.18, 22.47, 14.41. HPLC-MS (ESI+): 424.87 (98.95 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₃N₇O (423.57): C, 65.22; H, 7.85; N, 23.15. Found: C, 64.98; H, 7.95; N, 22.89.

4.4.12. N²-(4-aminocyclohexyl)-N⁶-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (41)

Yield: 81 %; M.p. = 118-121 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.19 (s(br), 1H), 7.81 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 6.38 (s, 1H), 6.11-6.09 (m, 1H), 3.98 (t, J = 4.6, 2H), 3.79 – 3.60 (m, 6H), 1.91 – 1.88 (m, 2H), 1.74-1.72 (m, 2H), 1.63 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 1.45 (n, J = 8.0, 1H), 1.33 – 1.04 (m, 4H), 0.87 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.80, 158.90, 152.50, 142.44, 138.62, 114.94, 99.06, 94.09, 55.58, 50.47, 50.32, 41.24, 38.78, 35.59, 31.79, 25.57, 22.73. HPLC-MS (ESI+): 453.90 (98.73 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₄H₃₅N₇O₂ (453.59): C, 63.28; H, 7.96; N, 19.24. Found: C, 63.45; H, 7.78; N, 19.31.

4.4.13. N²-(4-aminocyclohexyl)-N⁶-(3-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4m)

Yield: 59 %; M.p. = 99-102 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.61 (s(br), 1H), 8.28 (s(br), 1H), 7.84 (s, 1H), 7.24 (t, J = 8.1, 1H), 6.96 (d, J = 8.1, 1H), 6.55 (d, J = 5.6, 1H), 3.95 (t, J = 6.4, 2H), 3.67-3.60 (m, 1H), 2.59 – 2.50 (m, 1H), 1.94-1.88 (m, 2H), 1.82 – 1.69 (m, 5H), 1.29 – 1.10 (m, 12H), 0.80 (t, J = 6.8, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 153.59, 142.57, 139.56, 139.12, 133.29, 131.87, 130.34, 121.62, 119.55, 118.65, 114.12, 50.39, 42.95, 35.18, 31.78, 31.20, 29.67, 26.20, 22.48, 14.40. HPLC-MS (ESI+): 442.16 (99.99 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₂ClN₇ (442.01): C, 62.50; H, 7.30; N, 22.18. Found: C, 62.42; H, 7.33; N, 22.12.

4.4.14. N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(3-chlorophenyl)-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-purine-2,6diamine (4n)

Yield: 73 %; M.p. = 100-101 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.61 (s(br), 1H), 8.28 (s(br), 1H), 7.80 (s, 1H), 7.24 (t, *J* = 8.1, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.9, 1H), 6.52 (d, *J* = 8.2 1H), 5.34 (t, *J* = 7.0, 1H), 4.56 (d, *J* = 6.5, 2H), 3.69 – 3.59 (m, 1H), 1.94-1.90 (m, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 5H), 1.68 (s, 3H), 1.32 – 1.10 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 158.81, 152.11, 142.48, 138.71, 137.07, 133.37, 130.47, 121.73, 119.98, 119.48, 118.59, 114.03, 50.24, 49.11, 40.73, 34.44, 31.61, 25.85, 18.34. HPLC-MS (ESI+): 426.81 (95.58 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₂₈ClN₇ (425.96): C, 62.03; H, 6.63; N, 23.02. Found: C, 61.90; H, 6.85; N, 22.83.

4.4.15. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N⁶-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (40)

Yield: 68 %; M.p. = 183-184 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.34 (s(br), 1H), 7.98 (d, J = 8.5, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.22 (t, J = 8.5, 2H), 6.92 (t, J = 7.5, 1H), 6.44 (s(br), 1H), 3.96 (t, J = 5.5, 2H), 3.66 – 3.55 (m, 1H), 3.38 – 3.30 (m, 1H), 1.92 (d, J = 10.4, 2H), 1.80 – 1.64 (m, 4H), 1.29 – 1.00 (m, 6H), 0.86 (t, J = 7.4, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 221.80, 158.94, 152.56, 141.06, 138.60, 128.74, 122.11, 120.41, 114.06, 65.46, 50.60, 42.59, 36.07, 31.85, 19.78, 15.70, 13.94. HPLC-MS (ESI+): 380.10 (99.67 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₁H₂₉N₇ (379.51): C, 66.46; H, 7.70; N, 25.84. Found: C, 66.26; H, 7.83; N, 25.69.

4.4.16. N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(4-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4p)

Yield: 76 %; M.p. = 131-133 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.54 (s(br), 1H), 8.05 (d, J = 8.9, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.26 (d, J = 8.9, 2H), 6.51 (s(br), 1H), 3.95 (t, J = 6.1, 1H), 3.64 – 3.52 (m, 2H), 2.54 – 2.48 (m, 1H), 1.92 (d, J = 10.5, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 4H), 1.29 – 1.12 (m, 10H), 0.80 (t, J = 6.8, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.82, 152.21, 140.13, 128.92, 128.67, 128.37, 128.10, 125.55, 121.79, 114.06, 50.61, 42.93, 35.81, 31.84, 31.17, 29.66, 26.18, 22.47, 14.40. HPLC-MS (ESI+): 442.85 (98.39 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₃H₃₂ClN₇ (442.01): C, 62.50; H, 7.30; N, 22.18. Found: C, 62.48; H, 7.33; N, 22.14.

4.4.17. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N⁶-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4q)

Yield: 41 %; M.p. = 128-130 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.61 (s(br), 1H), 8.29 (s(br), 1H) 7.83 (s, 1H), 7.25 (t, J = 8.5, 1H), 6.95 (d, J = 7.5, 1H), 6.54 (s, J = 7.0, 1H), 3.95 (t, J = 6.4, 2H), 3.67 – 3.56 (m, 1H), 2.57 – 2.47 (m, 1H), 1.92-1.87 (m, 2H), 1.81 – 1.66 (m, 4H), 1.22 (m, 6H), 0.89 – 0.82 (m, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.82, 152.78, 152.23, 142.57, 139.13, 133.30, 130.34, 127.05, 121.63, 119.57, 118.66, 114.15, 50.31, 50.10, 42.66, 33.57, 31.82, 19.80, 13.95. HPLC-MS (ESI+): 413.90 (96.68 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₁H₂₈ClN₇ (413.95): C, 60.93; H, 6.82; N, 23.69. Found: C, 60.85; H, 6.88; N, 23.57.

4.4.18. 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4r)

Yield: 81 %; M.p. = 123-125 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.05 (s(br), 1H), 7.76 (s, 1H), 7.70 (d, J = 8.8, 2H), 6.64 (d, J = 8.8, 2H), 6.28 (s, 1H), 3.97 (t, J = 6.5, 2H), 3.62 – 3.50 (m, 1H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.78-1.73 (m, 2H), 1.67 – 1.59 (m, 2H), 1.45 (n, J = 6.5, 1H), 1.27 – 0.97 (m, 4H), 0.88 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.95, 152.90, 150.97, 138.04, 132.56, 122.27, 115.18, 113.78, 50.55, 41.20, 38.83, 35.79, 31.83, 25.57, 22.75. HPLC-MS (ESI+): 410.00 (95.83 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₃₁N₇O (409.54): C, 64.52; H, 7.63; N, 23.94. Found: C, 64.33; H, 7.75; N, 23.86.

4.4.19. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-isopentyl-N⁶-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (4s)

Yield: 81 %; M.p. = 150-152 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.33 (s(br), 1H), 7.98 (d, J = 7.8, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.22 (t, J = 7.8, 2H), 6.91 (t, J = 7.3, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.01 – 3.93 (m, 2H), 3.65 – 3.53 (m, 1H), 2.55-2.51 (m, 1H), 1.93 (d, J = 11.0, 2H), 1.77 (d, J = 11.7, 2H), 1.63 (sex, J = 6.5, 2H), 1.44 (non, J = 6.5, 1H), 1.32 – 1.05 (m, 4H), 0.87 (d, J = 6.6, 6H).¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.86, 152.48, 141.01, 138.50, 128.74, 122.10, 120.40, 114.03, 50.45, 41.24, 38.79, 35.38, 32.54, 31.73, 25.54, 22.73. HPLC-MS (ESI+): 394.00 (98.82 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₃₁N₇ (393.54): C, 67.15; H, 7.94; N, 24.91. Found: C, 66.98; H, 8.01; N, 24.83.

4.4.20. 3-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4t)

Yield: 86 %; M.p. = 144-145 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.17 (s(br), 1H), 7.81 (s, 1H), 7.40 (d, J = 7.8, 1H), 6.97 (t, J = 8.1, 1H), 6.34 (d, J = 7.8, 1H), 4.02 – 3.91 (m, 2H), 3.65 – 3.55 (m, 2H), 2.59 (s, 1H), 1.94-1.90 (m, 2H), 1.76 (d, J = 9.5, 2H), 1.62 (d, J = 6.7, 2H), 1.44 (non, J = 6.6, 1H), 1.30 – 1.07 (m, 6H), 0.87 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): δ 158.83, 157.88, 152.44, 152.44, 141.90, 138.50, 129.33, 114.01, 111.51, 109.52, 107.71, 57.12, 50.13, 33.65, 31.41, 29.53, 25.56, 22.73. HPLC-MS (ESI+): 410.00 (98.80 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₃₁N₇O (409.54): C, 64.52; H, 7.63; N, 23.94. Found: C, 64.47; H, 7.68; N, 23.92.

4.4.21. N²-(4-aminocyclohexyl)-N⁶-(3-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4u)

Yield: 79 %; M.p. = 115-117 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.59 (s(br), 1H), 8.27 (s(br), 1H), 7.84 (s, 2H), 7.23 (t, J = 8.1, 1H), 6.94 (d, J = 7.8, 1H), 6.52 (d, J = 7.4, 1H), 4.01 – 3.93 (m, 2H), 3.66 – 3.57 (m, 1H), 2.54 (t, J = 10.0, 1H), 1.91 (d, J = 10.8, 2H), 1.76 (d, J = 10.3, 2H), 1.64-1.60 (m, 2H), 1.44 (non, J = 6.5, 1H), 1.31 – 1.13 (m, 4H), 0.86 (d, J = 6.6, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 158.80, 157.84, 152.68, 152.20, 142.55, 138.93, 133.26, 130.31, 121.60, 119.53, 118.64, 114.09, 50.37, 41.28, 38.73, 35.05, 31.72, 25.61, 22.72. HPLC-MS (ESI+): 428.00 (97.00 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₂H₃₀ClN₇ (427.98): C, 61.74; H, 7.07; N, 22.91. Found: C, 61.55; H, 7.12; N, 22.83.

4.4.22. N²-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N⁶-(4-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4v)

Yield: 61 %; M.p. = 95-96 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.57 (s(br), 1H), 8.05 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.4, 2H), 6.54 (s(br), 1H), 3.96 (t, *J* = 6.5, 2H), 3.58 (s(br), 2H), 2.58 - 2.53 (m, 1H), 1.94-1.92 (m, 2H), 1.85 - 1.64 (m, 4H), 1.30 - 1.10 (m, 6H), 0.86 (t, *J* = 7.2, 3H). ¹³C NMR (126

MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 158.81, 152.72, 152.22, 140.12, 138.92, 128.52, 125.58, 121.78, 114.05, 50.28, 42.60, 34.70, 31.82, 31.62, 19.78, 13.94. HPLC-MS (ESI+): 414.00 (98.17 %). Elemental analysis Calcd. for C₂₁H₂₉N₇ (413.95): C, 60.93; H, 6.82; N, 23.69. Found: C, 60.85; H, 7.01; N, 23.57.

4.4.23. N^2 -(4-aminocyclohexyl)- N^6 -(4-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4w)

Yield: 83 %; M.p. = 94-97 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.56 (s(br), 1H), 8.05 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.51 (s(br), 1H), 4.11 – 3.87 (m, 2H), 2.58-2.54 (m, 1H), 1.94 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.43 (n, *J* = 6.5, 1H), 1.31 – 1.08 (m, 5H), 0.86 (d, *J* = 6.5, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 158.79, 152.60, 152.22, 140.12, 138.74, 128.52, 125.56, 121.79, 114.05, 50.47, 41.27, 38.79, 35.39, 31.73, 25.56, 22.73. HPLC-MS (ESI+): 427.90 (98.20 %). Elemental analysis Calcd. for $C_{22}H_{30}ClN_7$ (427.23): C, 61.74; H, 7.07; N, 22.91. Found: C, 61.55; H, 7.19; N, 22.73.

4.5. Cancer cell lines and cytotoxicity assay

Human cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection or the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, and were cultivated according to the provider's instructions. Briefly, MCF-7, BT474 and K562 cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). HCC827 and EOL-1 cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). All cell lines were cultivated at 37 °C in 5% CO₂. The cell lines display various alterations in tyrosine kinase genes: HCC827 has an acquired mutation in the EGFR tyrosine kinase domain (E746-A750 deletion), BT474 has an amplification of EGFR, and EOL-1 and K562 express the fusion kinases FIP1L1-PDGFR α and BCR-ABL, respectively. For the cytotoxicity assays, cells were treated in triplicate with six different doses of each compound for 72 h. After treatment, Calcein AM solution was added for 1 hour, and the fluorescence from live cells was measured at 485 nm/538 nm (excitation/emission) using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems). The GI₅₀ value, the drug concentration lethal to 50% of the cells, was calculated from the dose-response curves that resulted from the assays.

4.6. Protein kinase inhibition

CDK2/Cyclin E was produced in Sf9 insect cells via baculoviral infection and purified on a NiNTA column (Qiagen). PDGFR α was purchased from ProQinase. The kinase reactions were assayed with suitable substrates (1 mg/mL AGLT (poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) 6:2:5:1 hydrobromide) for PDGFR α and 1 mg/mL histone H1 for CDK2) in the presence of 1 and 15 μ M ATP for PDGFR α and CDK2, respectively, 0.05 μ Ci [γ -³³P]ATP, and the test compound in a final volume of 10 μ L, all in a reaction buffer (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-orthovanadate, 1.2 mM DTT, 2.5 μ g / 50 μ l PEG_{20.000}). The reactions were stopped by adding 5 μ L of 3% aq. H₃PO₄. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), washed 3× with 0.5% aq. H₃PO₄ and finally air-dried. Kinase

inhibition was quantified using a FLA-7000 digital image analyzer. The concentration of the test compounds required to reduce the kinase activity by 50 % was determined from dose-response curves and recorded as their IC_{50} . The protein kinase selectivity of compound **4e** was preliminarily evaluated at a single concentration (1 μ M) by screening against 50 enzymes as described previously [31].

4.7. Flow cytometry

Asynchronous cells were seeded into a 96 well plate and then, after a preincubation period, treated with the tested compounds for 24 hours. Adherent cells were first washed with PBS, trypsinized, and finally treated with a solution of trypsin inhibitor (0.1 %). After incubation, 5× staining solution (17 mM trisodium citrate dihydrate, 0.5% IGEPAL® CA-630, 7.5 mM spermine tetrahydrochloride, 2.5 mM Tris; pH 7.6 containing 50 µg/ml propidium iodide) was added. Leukemic cells were stained directly with the 5x staining solution (i.e. without trypsinization). The cells' DNA content was analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (BD FACS Verse with software BD FACSuiteTM, version 1.0.6.). Cell cycle distribution was analyzed using ModFit LT (Verity Software House, version 4.1.7). To correlate cell cycle changes with other parameters, the G_1/G_2 -M ratio for each combination of cell line and compound was calculated (at a dose corresponding to the compound's GI_{50} value) and divided by the G_1/G_2 -M ratio for untreated cells. These values were recorded as relative G_1/G_2 -M ratios.

4.8. Immunoblotting

Cell lysates were prepared by harvesting cells in Laemmli sample buffer. Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After blocking, the membranes were incubated with specific primary antibodies overnight, washed, and then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies. Finally, peroxidase activity was detected with ECL+ reagents (AP Biotech) using a CCD camera LAS-4000 (Fujifilm). Specific anti-PDGFR α (D1E1E) and anti-phospho-PDGFR α / β Y849/857 (C43E9), anti-phospho PDGFR α Y1018, anti-phospho-PDGFR α Y754 (23B2), anti-STAT3 (79D7), anti-phospho-STAT3 Y705 (D3A7), anti-ERK1/2, and anti-phospho-ERK1/2 T202/Y204, anti-phospho-MEK1/2 S217/221 (41G9) antibodies were purchased from Cell signaling, anti- α -tubulin (DM1A) was purchased from Sigma Aldrich, and anti-PCNA (clone PC-10) was generously gifted by Dr. B. Vojtěšek.

4.9. Statistics

All measurements were performed at least in triplicate. For statistical analysis, Pearson correlation coeficients were calculated from log-transformed values. P<0.01 and P<0.001 were considered statistically significant.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the institutional support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (National Program of Sustainability I, LO1204), the Ministry of Health of the Czech Republic (15-28951A) and Palacky University in Olomouc (IGA_PrF_2017_014).

References

- J. Zhang, P. Yang, N. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, Nat. Rev. Cancer. 9 (2009) 28–39. doi:10.1038/nrc2559.
- P.M. Fischer, Approved and Experimental Small-Molecule Oncology Kinase Inhibitor Drugs: A Mid-2016 Overview, Med. Res. Rev. 37 (2017) 314–367. doi:10.1002/med.21409.
- K.N. Nelson, M.N. Peiris, A.N. Meyer, A. Siari, D.J. Donoghue, Receptor Tyrosine Kinases: Translocation Partners in Hematopoietic Disorders, Trends Mol. Med. 23 (2017) 59–79. doi:10.1016/j.molmed.2016.11.002.
- [4] C.L. Corless, A. Schroeder, D. Griffith, A. Town, L. McGreevey, P. Harrell, S. Shiraga, T.
 Bainbridge, J. Morich, M.C. Heinrich, PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib., J. Clin. Oncol. 23 (2005) 5357–5364. doi:10.1200/JCO.2005.14.068.
- [5] J. Dai, Y. Kong, L. Si, Z. Chi, C. Cui, X. Sheng, L. Mao, S. Li, B. Lian, R. Yang, S. Liu, X. Xu, J. Guo, Large-scale analysis of PDGFRA mutations in melanomas and evaluation of their sensitivity to tyrosine kinase inhibitors imatinib and crenolanib., Clin. Cancer Res. 19 (2013) 6935–6942. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1266.
- [6] M. Hiwatari, T. Taki, M. Tsuchida, R. Hanada, T. Hongo, M. Sako, Y. Hayashi, Novel missense mutations in the tyrosine kinase domain of the platelet-derived growth factor receptor alpha(PDGFRA) gene in childhood acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) or inv(16)(p13q22)., Leukemia. 19 (2005) 476–477. doi:10.1038/sj.leu.2403638.
- [7] A. Reiter, J. Gotlib, Myeloid neoplasms with eosinophilia, Blood. 129 (2017) 704–714.
 doi:10.1182/blood-2016-10-695973.
- [8] J. Cools, D.J. DeAngelo, J. Gotlib, E.H. Stover, R.D. Legare, J. Cortes, J. Kutok, J. Clark, I. Galinsky, J.D. Griffin, N.C.P. Cross, A. Tefferi, J. Malone, R. Alam, S.L. Schrier, J. Schmid, M. Rose, P. Vandenberghe, G. Verhoef, M. Boogaerts, I. Wlodarska, H. Kantarjian, P. Marynen, S.E. Coutre, R. Stone, D.G. Gilliland, A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and

FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 1201–1214. doi:10.1056/NEJMoa025217.

- [9] J. Cools, H. Quentmeier, B.J.P. Huntly, P. Marynen, J.D. Griffin, H.G. Drexler, D.G. Gilliland, The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFRA-positive chronic eosinophilic leukemia, Blood. 103 (2004) 2802–2805. doi:10.1182/blood-2003-07-2479.
- [10] E. Lierman, C. Folens, E.H. Stover, N. Mentens, H. Van Miegroet, W. Scheers, M. Boogaerts, P. Vandenberghe, P. Marynen, J. Cools, Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFRalpha and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFRalpha T674I mutant., Blood. 108 (2006) 1374–6. doi:10.1182/blood-2006-02-004457.
- I. Sadovnik, E. Lierman, B. Peter, H. Herrmann, V. Suppan, G. Stefanzl, O. Haas, T. Lion, W. Pickl, J. Cools, P. Vandenberghe, P. Valent, Identification of Ponatinib as a potent inhibitor of growth, migration, and activation of neoplastic eosinophils carrying FIP1L1-PDGFRA., Exp. Hematol. 42 (2014) 282–293.e4. doi:10.1016/j.exphem.2013.12.007.
- [12] E. Lierman, L. Michaux, E. Beullens, P. Pierre, P. Marynen, J. Cools, P. Vandenberghe, FIP1L1-PDGFRalpha D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1-PDGFRalpha T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib., Leukemia. 23 (2009) 845–851. doi:10.1038/leu.2009.2.
- M. Yoshida, N. Tamagawa, T. Nakao, H. Kanashima, H. Ueda, A. Murakami, T. Yorifuji, T.
 Yamane, Imatinib non-responsive chronic eosinophilic leukemia with ETV6-PDGFRA fusion gene., Leuk. Lymphoma. 56 (2015) 768–769. doi:10.3109/10428194.2014.938330.
- [14] M. Zatloukal, R. Jorda, T. Gucky, E. Reznickova, J. Voller, T. Pospisil, V. Malinkova, H.
 Adamcova, V. Krystof, M. Strnad, Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9 trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases, Eur J Med Chem. 61 (2013)
 61–72. doi:10.1016/j.ejmech.2012.06.036.
- [15] T. Gucký, R. Jorda, M. Zatloukal, V. Bazgier, K. Berka, E. Řezníčková, T. Béres, M. Strnad, V. Kryštof, A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors, J. Med. Chem. 56 (2013) 6234–6247. doi:10.1021/jm4006884.
- [16] R. Jorda, L. Havlicek, I.W. McNae, M.D. Walkinshaw, J. Voller, A. Sturc, J. Navratilova, M. Kuzma, M. Mistrik, J. Bartek, M. Strnad, V. Krystof, Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity., J. Med. Chem. 54 (2011) 2980–2993. doi:10.1021/jm200064p.
- [17] M. Hylsova, B. Carbain, J. Fanfrlik, L. Musilova, S. Haldar, C. Kopruluoglu, H. Ajani, P.S.
 Brahmkshatriya, R. Jorda, V. Krystof, P. Hobza, A. Echalier, K. Paruch, M. Lepsik, Explicit treatment of active-site waters enhances quantum mechanical/implicit solvent scoring:
 Inhibition of CDK2 by new pyrazolo[1,5-a]pyrimidines., Eur. J. Med. Chem. 126 (2017) 1118–

1128. doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.023.

- B. Carbain, D.J. Paterson, E. Anscombe, A.J. Campbell, C. Cano, A. Echalier, J.A. Endicott, B.T. Golding, K. Haggerty, I.R. Hardcastle, P.J. Jewsbury, D.R. Newell, M.E.M. Noble, C. Roche, L.Z. Wang, R.J. Griffin, 8-substituted O 6-cyclohexylmethylguanine CDK2 inhibitors: Using structure-based inhibitor design to optimize an alternative binding mode, J. Med. Chem. 57 (2014) 56–70. doi:10.1021/jm401555v.
- [19] J. Eswaran, W.H. Lee, J.E. Debreczeni, P. Filippakopoulos, A. Turnbull, O. Fedorov, S.W. Deacon, J.R. Peterson, S. Knapp, Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs., Structure. 15 (2007) 201–213. doi:10.1016/j.str.2007.01.001.
- [20] X. Huang, P. Finerty, J.R. Walker, C. Butler-Cole, M. Vedadi, M. Schapira, S.A. Parker, B.E. Turk, D.A. Thompson, S. Dhe-Paganon, Structural insights into the inhibited states of the Mer receptor tyrosine kinase, J. Struct. Biol. 165 (2009) 88–96. doi:10.1016/j.jsb.2008.10.003.
- Y. Wang, C.A. 3rd Metcalf, W.C. Shakespeare, R. Sundaramoorthi, T.P. Keenan, R.S. Bohacek, M.R. van Schravendijk, S.M. Violette, S.S. Narula, D.C. Dalgarno, C. Haraldson, J. Keats, S. Liou, U. Mani, S. Pradeepan, M. Ram, S. Adams, M. Weigele, T.K. Sawyer, Bone-targeted 2,6,9trisubstituted purines: novel inhibitors of Src tyrosine kinase for the treatment of bone diseases., Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 3067–3070.
- [22] D. Dalgarno, T. Stehle, S. Narula, P. Schelling, M.R. van Schravendijk, S. Adams, L. Andrade, J. Keats, M. Ram, L. Jin, T. Grossman, I. MacNeil, C. Metcalf, W. Shakespeare, Y. Wang, T. Keenan, R. Sundaramoorthi, R. Bohacek, M. Weigele, T. Sawyer, Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds., Chem. Biol. Drug Des. 67 (2006) 46–57. doi:10.1111/j.1747-0285.2005.00316.x.
- [23] L. Havlíček, J. Hanuš, J. Veselý, S. Leclerc, L. Meijer, G. Shaw, M. Strnad, Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds, J. Med. Chem. 40 (1997) 408–412. doi:10.1021/jm960666x.
- [24] N.S. Gray, L. Wodicka, A.M. Thunnissen, T.C. Norman, S. Kwon, F.H. Espinoza, D.O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.H. Kim, D.J. Lockhart, P.G. Schultz, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors., Science. 281 (1998) 533–538.
- S. Sharma, J. Singh, R. Ojha, H. Singh, M. Kaur, P.M.S. Bedi, K. Nepali, Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 112 (2016) 298–346. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.018.
- [26] M.W. Karaman, S. Herrgard, D.K. Treiber, P. Gallant, C.E. Atteridge, B.T. Campbell, K.W. Chan,
 P. Ciceri, M.I. Davis, P.T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J.P. Hunt, D.J. Lockhart, Z. V Milanov,
 M.J. Morrison, G. Pallares, H.K. Patel, S. Pritchard, L.M. Wodicka, P.P. Zarrinkar, A quantitative

analysis of kinase inhibitor selectivity., Nat. Biotechnol. 26 (2008) 127–132. doi:10.1038/nbt1358.

- [27] S. Bach, M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S.P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D.C. Liang, H. Galons, J.F. Dierick, L.A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schächtele, A.S. Lerman, A. Carnero, Y. Wan, N. Gray, L. Meijer, Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase, J. Biol. Chem. 280 (2005) 31208–31219. doi:10.1074/jbc.M500806200.
- [28] T. O'Hare, R. Pollock, E.P. Stoffregen, J.A. Keats, O.M. Abdullah, E.M. Moseson, V.M. Rivera, H. Tang, C.A. 3rd Metcalf, R.S. Bohacek, Y. Wang, R. Sundaramoorthi, W.C. Shakespeare, D. Dalgarno, T. Clackson, T.K. Sawyer, M.W. Deininger, B.J. Druker, Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML, Blood. 104 (2004) 2532–2539. doi:10.1182/blood-2004-05-1851.
- [29] E.H. Stover, J. Chen, C. Folens, B.H. Lee, N. Mentens, P. Marynen, I.R. Williams, D.G. Gilliland, J. Cools, Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 8078–8083. doi:10.1073/pnas.0601192103.
- [30] A.M. Oseini, L.R. Roberts, PDGFRalpha: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma?, Expert Opin. Ther. Targets. 13 (2009) 443–454. doi:10.1517/14728220902719233.

[31] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. Mclauchlan, I. Klevernic, J.S.C. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, Biochem. J. 408 (2007) 297–315. doi:10.1042/BJ20070797.





Supplementary data

Trisubstituted purine inhibitors of PDGFR α and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell line EOL-1

Veronika Malínková^{a,b}, Eva Řezníčková^b, Radek Jorda^b, Tomáš Gucký^a, Vladimír Kryštof^b

^aDepartment of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^bLaboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

*Corresponding Author. Vladimír Kryštof, Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic. Phone: +420585634854, Fax: +420585634870. E-mail: vladimir.krystof@upol.cz Supplementary table 1. Preliminary kinase selectivity of compound 4e assayed at a single concentration of 1 μ M.

kinase	Residual activity (%)
AMPK	80
Aurora B	47
BTK	58
CAMK1	93
CAMKKb	81
CK1δ	106
CK2	82
DYRK1A	20
FF2K	107
EPHA2	80
GSK3h	75
HEDA	21
	101
	101
	99
	83
	100
JAK2	94
JNK1	99
LCK	60
LKB1	117
MARK3	91
MKK1	90
MLK3	50
MSK1	73
MST2	99
NEK6	91
p38a MAPK	108
PAK4	71
PDK1	97
PIM1	85
PKA	96
РКВа	83
РКСа	92
PKD1	108
PLK1	100
PRK2	76
RIPK2	94
ROCK2	
RSK1	65
S6K1	66
SGK1	56
SmMI CK	00
Shinicon	99 75
	10
	92
JIN TAKA	86
	86
	106
I rkA	44
ITK	83
VEGFR	63





Figure 1: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3-chlorobenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4a)



Figure 2: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3-chlorobenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4a)



Figure 3: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorobenzyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4b)



Figure 4: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorobenzyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4b)



Figure 5: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4c)



Figure 6: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purine-2,6-diamine (4c)



Figure 7: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-benzyl-N6-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4d)



Figure 8: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-benzyl-N6-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4d)



Figure 9: 1H NMR spectrum of (E)-N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-9H-purine-2,6-diamine (4e)



Figure 10: 13C NMR spectrum of (E)-N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-yl)-9H-purine-2,6-diamine (4e)



Figure 11: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(2,4-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4f)



Figure 12: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(2,4-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4f)



Figure 13: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9H-purine-2,6-diamine(4g)



Figure 13: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9H-purine-2,6-diamine(4g)



Figure 15: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4h)



Figure 16: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4h)


Figure 17: 1H NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-cyclohexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4i)



Figure 17: 13C NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-cyclohexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4i)



Figure 19: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-cyclohexyl-9H-purine-2,6-diamine (4j)



Figure 20: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-cyclohexyl-9H-purine-2,6-diamine (4j)



Figure 21: 1H NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-hexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4k)



Figure 22: 13C NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-hexyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4k)



Figure 23: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4l)



Figure 24: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3,5-dimethoxyphenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4l)



Figure 25: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4m)



Figure 26: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4m)



Figure 27: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-purine-2,6-diamine (4n)



Figure 28: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9H-purine-2,6-diamine (4n)



Figure 29: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (40)



Figure 30: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (40)



Figure 31: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4p)



Figure 32: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-hexyl-9H-purine-2,6-diamine (4p)



Figure 33: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4q)



Figure 34: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(3-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4q)



Figure 35: 1H NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4r)



Figure 36: 13C NMR spectrum of 4-((2-((4-aminocyclohexyl)amino)-9-isopentyl-9H-purin-6-yl)amino)phenol (4r)



Figure 37: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-isopentyl-N6-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (4s)



Figure 38: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-isopentyl-N6-phenyl-9H-purine-2,6-diamine (4s)



Figure 39: 1H NMR spectrum of (4t)



Figure 40: 13C NMR of (4t)



Figure 41: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4u)



Figure 42: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(3-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4u)



Figure 43: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(4-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4v)



Figure 44: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-9-butyl-N6-(4-chlorophenyl)-9H-purine-2,6-diamine (4v)



Figure 45: 1H NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4w)



Figure 46: 13C NMR spectrum of N2-(4-aminocyclohexyl)-N6-(4-chlorophenyl)-9-isopentyl-9H-purine-2,6-diamine (4w)

PŘÍLOHA III.

Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., **Malínková V.**, *et al* (2017) Discovery of N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Discovery of N²-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N⁶-(4morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia

Manuscript IDDraftManuscript Type:ArticleDate Submitted by the Author:n/aComplete List of Authors:Tomas, Gucky; Palacký University, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research Rezníčková, Eva; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Regior Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Radosova Muchova, Tereza; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacký University, Alboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Malinkova, Veronika; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University Berka, Karel; Palacky University Olomouc, Physical Chemistry Bazgier, Vaclav; Palacký University Olomouc, AJANI, HARESH; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department 	Journal:	Journal of Medicinal Chemistry
Manuscript Type:ArticleDate Submitted by the Author:n/aComplete List of Authors:Tomas, Gucky; Palacký University, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research Rezníčková, Eva; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Regior Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Radosova Muchova, Tereza; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacky University & Institute of Experimental Botany ASC Klejova, Zuzana; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Malinkova, Veronika; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University Berka, Karel; Palacky University Olomouc, Physical Chemistry Bazgier, Vaclay; Palacký University Olomouc, AJANI, HARESH; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department of Chemistry	Manuscript ID	Draft
Date Submitted by the Author: n/a Complete List of Authors: Tomas, Gucky; Palacký University, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research Řezníčková, Eva; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Radosova Muchova, Tereza; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacky University & Institute of Experimental Botany ASC Laboratory of Growth Regulators Klejova, Zuzana; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Malinkova, Veronika; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University Berka, Karel; Palacky University Olomouc, Physical Chemistry Bazgier, Vaclav; Palacký University Olomouc, AJANI, HARESH; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department of Chemistry	Manuscript Type:	Article
Complete List of Authors: Tomas, Gucky; Palacký University, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research Řezníčková, Eva; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Radosova Muchova, Tereza; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacky University & Institute of Experimental Botany ASC Laboratory of Growth Regulators Klejova, Zuzana; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Malinkova, Veronika; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University Berka, Karel; Palacky University Olomouc, Physical Chemistry Bazgier, Vaclav; Palacký University Olomouc, AJANI, HARESH; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Departme of Chemietry	Date Submitted by the Author:	n/a
Lepsik, Martin; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department Chemistry Divoky, Vladimir; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Krystof, Vladimir; Palacky University, Laboratory of Growth Regulators	Complete List of Authors:	Tomas, Gucky; Palacký University, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research Řezníčková, Eva; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University, Radosova Muchova, Tereza; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Jorda, Radek; Palacky University & Institute of Experimental Botany ASCR, Laboratory of Growth Regulators Klejova, Zuzana; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Malinkova, Veronika; Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany ASCR & Palacký University Berka, Karel; Palacky University Olomouc, Physical Chemistry Bazgier, Vaclav; Palacký University Olomouc, AJANI, HARESH; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department of Chemistry Lepsik, Martin; Ustav organicke chemie a biochemie AV CR, Department of Chemistry Divoky, Vladimir; Palacký University, Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Krystof, Vladimir; Palacky University, Laboratory of Growth Regulators

SCHOLARONE[™] Manuscripts

Discovery of N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia

Tomáš Gucký^a, Eva Řezníčková^b, Tereza Radošová Muchová^c, Radek Jorda^b, Zuzana Klejová^c, Veronika Malínková^a, Karel Berka^d, Václav Bazgier^d, Haresh Ajani,^{d,e} Martin Lepšík^e, Vladimír Divoký^c, Vladimír Kryštof^b

^a Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^b Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^c Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, 775

15 Olomouc, Czech Republic

^d Department of Physical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^e Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo

nam. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

Abstract

FLT3 is a potential drug target in acute myeloid leukemia (AML) because patients with FLT3-ITD mutations respond poorly to standard cytotoxic agents and there is a clear link between the disease and the oncogenic properties of FLT3. We present a novel series of 2,6,9-trisubstituted purine derivatives with potent FLT3 inhibitory activity. The lead inhibitor **7d** displays nanomolar activity in biochemical assays and selectively blocks proliferation of AML cell lines harboring FLT3-ITD mutations, whereas other transformed and normal human cells are several orders of magnitude less sensitive. The proposed mechanism of action is confirmed by the dose-dependent suppression of phosphorylation of FLT3 and its downstream signaling pathways, with subsequent G1 cell cycle arrest and apoptosis in MV4-11 cells. Docking of **7d** to FLT3 suggests type I binding mode and explains the structural determinants of the high affinity. Additionally, a single dose of **7d** in mice with subcutaneously implanted MV4-11 xenografts caused sustained inhibition of FLT3 and STAT5 phosphorylation over 48 hours, in contrast to the shorter effect observed after quizartinib administration. Taken together, we propose **7d** to be further explored in search for novel FLT3-targeted anticancer agents.

Keywords

acute myeloid leukemia, FLT3, kinase inhibitor, docking, drug design

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a cancer for which current therapies are inadequate. Recent advances in molecular cancer biology have enhanced our understanding of AML biology and led to the discovery of many cancer-related genes, including potential targets for treatment.¹ The most common mutations in AML occur in the *FLT3* gene; the mutations are observed in approximately 30 % of AML patients and are tightly linked to poor prognosis.² The *FLT3* gene encodes the membrane-bound receptor tyrosine kinase FLT3, which is closely related to KIT, FMS and PDGFR.³ Upon binding to an extracellular ligand, FLT3 dimerizes, gets autophosphorylated, and activates downstream signaling pathways including RAS/MAPK, JAK/STAT5 and PI3K/AKT. These pathways collectively promote growth, proliferation, survival and differentiation of myeloid cells.

The most common group of *FLT3* mutations (found in 23% of all AML patients) are internal tandem duplications (ITD) of variable length and position that promote ligand-independent dimerization.⁴ The length of ITD mutations influences prognosis: patients with longer ITDs have worse outcomes and lower overall survival.⁵ Point mutations within the activation loop of FLT3 are also somewhat common, occurring in approximately 7 % of all AML cases. These mutations stabilize the kinase in its active conformation and promote constitutive activation.

FLT3 is regarded as a potential drug target because patients with FLT3-ITD mutations respond poorly to standard cytotoxic agents and there is a clear link between AML and the oncogenic properties of FLT3.⁶ Consequently, many groups have attempted to develop specific FLT3 inhibitors for AML therapy and a variety of drugs have entered clinical trials.⁶⁻⁸ Early trials used general receptor tyrosine kinase inhibitors such as sunitinib, sorafenib or lestaurtinib that exhibit activity against FLT3 but were originally developed for other indications.⁷ These compounds were quite potent in preclinical experiments, but generally failed in phase I/II clinical trials with AML patients.

The toxicity problems and limited efficacy of these drugs are probably due to their broad specificity towards receptor tyrosine kinases.^{7,8} Therefore, new and more specific FLT3 inhibitors have been developed. These so-called second-generation compounds include quizartinib, crenolanib, pexidartinib (PLX3397), tandutinib (MLN518) and gilteritinib (ASP2215). These compounds

demonstrated significant numbers of complete and partial responses in AML patients⁷ and are often also active in quizartinib-resistant AML cells with secondary FLT3 point mutations.^{9,10}

Some of the developed compounds are multi-targeted anti-FLT3 drugs effective against both AML and other indications. For example, the doubly-selective JAK2/FLT3 inhibitor pacritinib was successful in phase 2 clinical trials against myelofibrosis and lymphoma.¹¹ Similarly, the clinically tested compound gilteritinib targets FLT3 and AXL,¹⁰ while TG02 (SB1317) inhibits FLT3, JAK2, and all cyclin-dependent kinases (CDKs).¹² The effectiveness of simultaneously targeting FLT3 and CDKs is further demonstrated by the example of AMG 925 (FLX925), which selectively targets FLT3 and CDK4.^{13,14} Despite these promising results, acquired resistance to specific FLT3 inhibitors continues to present a major challenge in drug development.

We have previously prepared nanomolar CDK inhibitors with a 6-benzylaminopurine scaffold,¹⁵ but we found that modified analogs (in which the 6-benzylaminopurine core was replaced with a 6-anilinopurine) exhibited substantially reduced cytotoxic activity in most cancer cell lines other than MV4-11. Cells from this line rapidly stopped proliferating and entered G1 phase arrest upon treatment with nanomolar concentrations, whereas the other tested cell lines did not respond to sub-micromolar concentrations. Here we report the preparation of a new set of compounds in this series and demonstrate that their target in the MV4-11 cell line is FLT3.

Results and discussion

Chemistry

 The synthesis started from commercially available 2,6-dichloropurine, which was initially alkylated with isopropanol, cyclopentanol or benzyl alcohol *via* the Mitsunobu reaction to obtain 9-substituted-2,6-dichloro-9*H*-purines 1a,¹⁶ $1b^{15}$ and $1c^{17}$ with good regioselectivity. 2,6-dichloro-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine (1d) was prepared using the previously described reaction of 2,6-dichloro-9*H*-purine with 3,4-dihydro-2H-pyran.¹⁸

Most of the used 4-substituted-phenylamines were commercially available, but 6-morpholin-4ylpyridin-3-amine (**4a**) and 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)aniline (**4b**) were prepared by the reaction of 4-bromonitrobenzene (**2a**) or 2-bromo-5-nitropyridine (**2b**) with the corresponding cyclic

ACS Paragon Plus Environment
Journal of Medicinal Chemistry

secondary amine to yield nitro derivatives (**3a**, **3b**) that were reduced with hydrogen on palladium at atmospheric pressure (see Supporting information Scheme S1).

The nucleophilic substitution at position 6 of the purine moiety with appropriate 4-substitutedaniline or 2-substituted-5-aminopyridine derivatives was performed in the presence of Hünig's base to obtain compounds (**5a-5m**). The substitution of the chlorine at position 2 with a primary or secondary amine was performed with a large excess of the appropriate amine in 1,2-ethandiol at 160 °C. These reactions proceeded smoothly, providing the desired compounds with good yields and high purities (see Scheme 1). We used trans-1,4-diaminocyclohexane for the synthesis of compounds **6a**, **6c**, **6d**, **6h**, **6l**, **7a** - **7f** and **8l**. The 2-aminopropan-1-ol used for the synthesis of compounds **6b**, **6e**, **6f**, **6i** and **6m** was racemic and for the synthesis of compound **8l** 2-aminobutan-1-ol of R- configuration was used. The full collection of newly synthesized compounds (**5a-5m**, **6a-6o**, **7a-f**, and **8a-8o**) is presented in Table 1.



Scheme 1.

Reaction conditions: a) appropriate 4-substituted aniline or 6-substituted-pyridine-3-amine, DIPEA, n-propanol, 120 °C, 4-20 hours, sealed tube; b) appropriate primary or secondary amine, 1,2-ethandiol, 160 °C, 4-20 hours, sealed tube.

Table 1. Synthesized co	mpounds 5a-5m , 6a	a-60 , 7a-7f and 8a-80 .
-------------------------	---------------------------	---

Cmpd	R1	R2	R3	Q
5a	Isopropyl	Cl	Br	СН
5b	Cyclopentyl	Cl	Br	СН

5c	Cyclopentyl	Cl	Cl	СН
5d	Benzyl	Cl	Br	СН
5e	Benzyl	Cl	N_O	СН
5f	Tetrahydropyran-2-yl	Cl	Br	СН
5g	Cyclopentyl	Cl	-{	СН
5h	Cyclopentyl	Cl	-§-N_O	СН
5i	Cyclopentyl	Cl	-§-N_N_	СН
5j	Cyclopentyl	Cl	N_O	СН
5k	Cyclopentyl	Cl	-§-N/O	СН
51	Cyclopentyl	Cl	ist NNN	СН
5m	Cyclopentyl	Cl	-ξ-N_O	N
6a	Isopropyl	HN HN	Br	СН
6b	Isopropyl	OH CH3	Br	СН
6c	Cyclopentyl	HN NH2	Br	СН
6d	Cyclopentyl	HN NH2	Cl	СН
6e	Cyclopentyl	OH CH3	Cl	СН
6f	Cyclopentyl	OH CH3	Br	СН
6g	Cyclopentyl	-ᢤNH HO→CH ₃	Br	СН
6h	Benzyl	HN NH2	Br	СН
6i	Benzyl		Br	СН
6j	Benzyl	-§-NO	Br	СН
6k	Benzyl	-ξ-N_N-CH ₃	Br	СН

Page 7 of 47

Journal of Medicinal Chemistry

61	Tetrahydropyran-2-yl	HN NH2	Br	СН
6m	Tetrahydropyran-2-yl		Br	СН
6n	Tetrahydropyran-2-yl	Q	Br	СН
60	Tetrahydropyran-2-yl	-{-N_N-CH3	Br	СН
7a	Cyclopentyl	HN: NH2	-{	СН
7b	Cyclopentyl	HN: NH2	-{-{-N_O	СН
7c	Cyclopentyl	HN HN	-{-{N_N_/	СН
7d	Cyclopentyl	HNI NH2	rd N_O	СН
7e	Cyclopentyl	HN NH2	-§-N	СН
7f	Cyclopentyl	HNI NH2	^x _x ^x N N	СН
8a	Cyclopentyl	NH2	N_O	СН
8b	Cyclopentyl	H N N NH ₂	here N O	СН
8c	Cyclopentyl	NH2	Pri N	СН
8d	Cyclopentyl	-ۇ-NH	N_N_O	СН
8e	Cyclopentyl	O, CH3	n N O	СН
8f	Cyclopentyl		r ^{der} NO	СН
8g	Cyclopentyl	-{	ru-N_O	СН
8h	Cyclopentyl	-ξ-N	run N	СН
8i	Cyclopentyl	[₹] ⁵ N∕∕∕OH		СН
8j	Cyclopentyl	H N OH	² ² N O	СН
8k	Cyclopentyl	H N OH	ru-N_O	СН
81	Cyclopentyl	HN H	-§-N_O	N



In Vitro Structure-Activity Relationships

The newly prepared 6-(4-substituted-anilino)purine (**6a-6o**, **7a-7f**, **8a-8o**) and 6-(5-substituted-3aminopyridine)purine (**8l**, **8m**) compounds were tested to determine their ability to inhibit the FLT3-ITD kinase and to evaluate their antiproliferative activity in the MV4-11 (FLT3-ITD) and K562 cell lines. Tables 2-4 summarize the results obtained.

We began our investigation into the compounds' structure-activity relationships using molecules 6c and 6d, which exhibited high selectivity towards FLT3-ITD-positive cells and only weak activity in other cancer cell lines. Both these compounds have aminocyclohexylamino and 4halogenophenylamine groups at positions 2 and 6, respectively, with a cyclopentyl group at position 9. To study the impact of substituting position 9 of the purine ring, we compared these initial compounds to a series of analogs with the same substituents at positions 2 and 6 but isopropyl, tetrahydropyran-2yl, or benzyl groups at position 9. The lowest GI_{50} values in MV4-11 cells were obtained with compounds bearing isopropyl (6a) and cyclopentyl (6c and 6d) substituents (7, 10 and 1 nM, respectively); these compounds were also very potent inhibitors of FLT3-ITD. Introducing the tetrahydropyran-2-yl group (61) reduced both the cellular and kinase-inhibitory activities of the compounds, but the lowest activities were observed for compound 6h, which has a benzyl group in position 9. To verify the positive impact of substituent 9, we also modified position 2 by replacing the aminocyclohexylamino group with various branched alkylamines or bulky morpholino or 4-methylpiperazin-1-yl moieties. All the analogs substituted in this way had weaker antiproliferative and FLT3inhibitory activities than the 4-aminocyclohexylamine-substituted compounds, and substantially higher IC₅₀ and GI₅₀ values (Table 2).

Page 9 of 47

Journal of Medicinal Chemistry

We next explored the effect of extended substituents at position 6. All the compounds tested in these experiments had a cyclopentyl group at position 9 and an aminocyclohexylamino group at position 2. The halogen in the phenylamine substituent of the lead molecule was replaced with pyrrolidin-1-yl (**7a**), morpholin-4-yl (**7b**), 4-ethyl-piperazin-1-yl (**7c**), morpholin-4-ylmethyl (**7d**), 2oxa-6-aza-spiro[3.3]hept-6-yl (**7e**) or N-4-benzyl-piperazin-1-yl (**7f**) moieties. These compounds were among the most active in the entire series: their GI_{50} values in FLT3-ITD positive MV4-11 cells were in the single-digit nanomolar range, and approximately 100 times lower than the corresponding values for K562 cells. They also strongly inhibited the enzymatic activity of FLT3-ITD at low nanomolar concentrations. These results indicate that position 6 can host various substitutions without significant loss of *in vitro* activity (Table 3).

Since the most active compounds of the series (7d, 7b, 7c) have a cyclopentyl group in position 9 and extended 6-(4-substituted-phenylamino) groups, we investigated analogs of these compounds with modifications at position 2 to determine whether the aminocyclohexylamine moiety is the optimal substituent with respect to *in vitro* activity. We investigated linear aminoalkylamines (8a, 8b, 8c, 8n, 8o), hydroxyalkylamines (8i, 8j, 8k), and bulky saturated heterocyclic moieties (8d, 8e, 8f, 8g, 8h, 8m). Compounds with an aminobutylamine group in position 2 (8a, 8n, 8o) showed comparable potency against FLT3-ITD to starting molecules 7d, 7b, 7c and inhibited MV4-11 proliferation at low nanomolar concentrations, with GI₅₀ values of about 11 nM. Longer aminoalkyl side chains yielded weaker antiproliferative and kinase-inhibitory activities: the FLT3-ITD IC₅₀ values for the butyl- (8a), pentyl- (8b), and hexyl- (8c) substituted compounds were 1, 5, and 10 nM, respectively, and the corresponding MV4-11 GI_{50} values were 11, 35, and 86 nM, respectively. Compounds with hydroxyalkylamines in position 2 (8i, 8j, 8k) exhibited weaker biological activity: the most potent of these derivatives (8k) was 6 times less potent than 7d with respect to FLT3-ITD inhibition, and had a 40-fold higher GI_{50} value in MV4-11 cells. Shortening of the hydroxyalkyl chain (hydroxyethylamine 8i and hydroxypropylamine 8j) further reduced their *in vitro* activity. Similarly low activities were achieved with compounds bearing bulky morpholine (8f) or methylpiperazine (8g) substituents in position 2: the least active compounds in the group were those bearing piperidine (8h), benzylamine (8d), or 4-methoxybenzylamine (8e) moieties (Table 4).

Our synthetic approach allowed us to further modify the first aromatic ring in position 6; we replaced the phenylamine with pyridinamine and extended it with morpholine (**81**, **8m**). This modification did not improve the molecules' biological activity - for example, compound **81** displayed similar activity to its phenylamine counterpart **7b** (Tables 3 and 4).

To investigate the cellular selectivity of the new compounds, the antiproliferative activities of the most potent derivatives were tested in cancer cell lines with different histological origins and in noncancerous cells (Table 5). The compounds exhibited nanomolar activity in the MOLM-13 line (which is FLT3-ITD-positive, like MV4-11), but their GI_{50} values in other cancer cell lines were in the micromolar range, confirming their high selectivity towards FLT3-ITD-positive cells. Notably, Kasumi-1 and HCC-827 cells bearing an activating mutation in cKit (Asn822Lys) and an activating deletion in EGFR, respectively, displayed submicromolar sensitivity to compounds **7a–7e**, and compounds from series **8** (**8a** – **8d**, **8o**, **8n**) seemed to be even more selective for FLT3-ITD-positive cell lines. Importantly, nontransformed human MRC-5 and HUVEC cells, as well as nonproliferating BJ cells, were not affected by these compounds even when treated with concentrations 1000-fold higher than those toxic against the FLT3-ITD positive MV4-11 and MOLM-13 cell lines.

 Table 2. 2-substituted-amino-6-(4-halogenophenyl)amino-9-substituted-9H-purines 6a-60 and their

 biochemical and cellular activities.

Cmnd	IC ₅₀ (µM)	GI ₅₀ (μM)				
Cinpu	FLT3- ITD	MV4-11	K562			
6a	0.010	0.007	1.173			
6b	0.591	0.914	17.800			
6c	0.004	0.010	0.670			
6d	0.005	0.001	0.840			
6e	1.723	0.276	10.910			
6f	0.628	0.513	>25			

	0.001		- (2)
6g	0.281	0.737	7.630
6h	0.798	0.818	3.067
6i	9.848	>4	9.447
6j	>20	>4	>12.5
6k	>20	>4	3.800
61	0.070	0.164	5.170
6m	1.141	1.313	27.900
6n	1.195	3.712	3.745
60	4.207	1.405	7.130

Tested at least in duplicates.

 Table 3. 2-(4-aminocyclohexylamino)-6-(4-substituted-phenyl)amino-9-cyclopentyl-9H-purines 7a-7f

their biochemical and cellular activities.

Cmnd	IC ₅₀ (µM)	GI ₅₀ (µM)				
Cinpu	FLT3-ITD	MV4-11	K562			
7a	0.003	0.010	0.940			
7b	0.002	0.002	0.965			
7c	0.003	0.001	2.070			
7d	0.003	0.002	0.380			
7e	0.004	0.003	1.220			
7f	0.006 0.017		0.700			

Tested at least in duplicates.

Table 4. 9-cyclopentyl-2-substituted-amino-6-arylamino-9H-purines 7d, 8a-8o and their biochemical

and cellular activities.

Cmnd	IC ₅₀ (µM)	GI ₅₀ (μM)				
Стра	FLT3 ITD	MV4-11	K562			

7d	0.003	0.002	0.380
8a	0.001	0.011	2.095
8b	0.005	0.035	1.530
8c	0.010	0.086	3.787
8d	0.026	0.196	3.597
8e	0.209	0.892	6.693
8f	0.019	0.061	4.470
8g	0.053	0.066	2.745
8h	0.050	0.701	11.023
8i	0.029	0.110	2.0.05
8j	0.047	0.157	2.348
8k	0.018	0.083	1.452
81	0.004	0.004	1.297
8m	0.071	0.070	37.500
8n	0.002	0.011	3.490
80	0.001	0.012	1.335

Tested at least in duplicates.

Table 5. Biochemical and cellular activities of the most potent compounds.

	IC ₅₀	(µM)			GI ₅₀ (μM)						
	FLT3 WT	FLT3	MOLM-	Kasumi-	THP-1	U937	MCF-7	HCC-	MRC-5	HUVEC	BJ
6c	0.016	0.004	0.015	0.481	2.280	1.797	0.520	1.344	12.791	10.062	14.688
7a	0.021	0.011	0.024	0.569	3.114	3.171	0.487	1.253	13.901	12.077	15.894
7b	0.021	0.007	0.004	0.816	1.159	1.572	0.320	0.491	23.102	4.531	12.249
7c	0.010	0.002	0.004	0.839	0.514	0.605	1.050	0.544	20.109	4.439	12.932
7d	0.013	0.008	0.001	0.513	0.713	0.664	0.197	0.327	19.939	5.866	12.663

7e	0.013	0.028	0.004	0.773	0.693	0.638	1.063	0.456	8.206	5.947	14.580
8 a	0.006	0.005	0.019	2.241	3.739	1.341	2.105	1.664	3.972	6.265	10.351
8b	0.025	0.065	0.020	1.248	2.418	3.629	2.120	1.423	5.412	14.165	11.174
8c	0.021	0.069	0.054	1.233	3.590	2.920	5.004	1.756	3.377	10.321	7.265
8d	0.083	0.624	0.122	5.190	>10	9.793	8.600	>5	24.787	10.105	>25
8n	0.023	0.007	0.017	2.016	6.906	4.070	3.255	1.388	8.171	8.058	12.976
80	0.013	0.003	0.010	2.071	4.355	3.419	2.150	0.978	10.050	11.421	15.389

Tested at least in duplicates.

Binding mode in FLT3 active site

Similar inhibition of WT and D385 FLT3 enzymes (Table 5) suggests that the presented inhibitors have type I binding. To analyze it, we prepared a homology model of the active conformation of the kinase (activation loop-out; DFG-in) and docked the lead compound **7d**. The binding mode is consistent with type I binding, *i.e.* hinge-region hydrogen bonds and 2,6,9-substituents pointing to their respective pockets (Figure 1). In the hinge region, Cys694 backbone forms two classical H-bonds with **7d** (Cys694:N-H...**7d**:N22 and Cys694:O...**7d**:N27-H) and Glu692 forms one weak H-bond with **7d** (Glu692:O...**7d**:C21-H). The cyclopentyl ring of **7d** makes hydrophobic contacts with several hydrophobic residues including the F691 gatekeeper. The 1,4-diaminocyclohexyl moiety uses its protonated distal 4-amino group to make a salt bridge with Asp829. Further modeling showed that many of the non-hinge-region interactions would be lost in compounds such as **6j**, resulting in a loss of activity. The N atom of the N-methyl morpholino group (pKa of 7.38) loses the proton upon making H-bond with Lys614.



Figure 1. Docked binding pose of **7d** (orange sticks) in FLT3. The kinase (cyan cartoon) is modeled in active conformation; the P-loop (green cartoon), helix-C (magenta) and activation loop (AL; yellow) are highlighted. FLT3 interacting residues are shown as sticks colored grey for carbon, blue for nitrogen, red for oxygen, yellow for sulfur and white for hydrogen. Figure prepared with Maestro, Schrodinger, LLC.

Protein Kinase Selectivity

In addition to FLT3-ITD, most of the active compounds were also potent inhibitors of wild-type FLT3 and, even more importantly, of an FLT3 variant bearing the D835 point mutation, which contributes to the development of resistance (Table 5). Compound **7d**, the most active candidate, was then screened for its activity against 309 protein kinases (Carna Biosciences). This screening confirmed **7d** as a potent inhibitor of FLT3. It also achieved significant inhibition (>90%) against several other kinases at a concentration of 10 nM, notably PDGFR α/β , CLK1, TRK, QIK, CaMK2 δ , SIK, YES, FMS, CAMK2 γ , KIT (D816V), MNK2, ACK and SRC (For more details, see the Supporting information Table S1).

Cellular activity of 7d is related to FLT3-inhibition

Because compound 7d inhibited the proliferation of FLT3-ITD positive MV4-11 and MOLM-13 cell lines very effectively at low nanomolar concentrations (GI₅₀ values 2 and 1 nM, respectively), we investigated its molecular mechanism of action in cells. MV4-11 cells were treated for 1 hour with increasing concentrations of the compound and analyzed by immunoblotting, revealing that concentrations as low as 1 nM were sufficient to block the autophosphorylation of the FLT3 receptor tyrosine kinase at three different tyrosine residues (589, 591 and 842). Moreover, this inhibition suppressed phosphorylation of several downstream targets of FLT3. Notably, 7d abolished phosphorylation of STAT5 at Y694, which is a direct substrate of the oncogenic FLT3-ITD variant. The second pathway affected was the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade: two key components of this signaling pathway, ERK1/2 (T202/Y204) and MEK1/2 (S217/221), exhibited reduced phosphorylation upon treatment with our compound (Figure 2). Similar results were obtained in MV4-11 cells after treatment with clinically-tested FLT3 inhibitor quizartinib (Figure S1). Because the MAPK and STAT pathways are crucial regulators of cell proliferation, their inhibition induces cell cycle arrest in the G1 phase. To confirm this, MV4-11 cells were treated for 24 hours with increasing doses of compound 7d and quizartinib, stained with propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Even a 1 nM concentration induced massive G1 arrest. In addition, higher doses increased the number of cells in the sub-G1 phase of the cell cycle, corresponding to an increased number of apoptotic cells (Figure 3A, Figure S2). This result was verified by immunoblotting, which revealed increased cleavage of the apoptotic marker protein PARP-1 upon treatment with 7d at 10 or 100 nM for 24 hours. This cleavage was accompanied by reduced levels of the antiapoptotic protein Mcl-1 (Figure 3B). To confirm that the proapoptotic effect of our compound is closely related to the presence of oncogenic FLT3 variants, we studied the activation of caspases, which play key roles in apoptotic cascades, in MV4-11 (FLT3-ITD) and K562 (no expression of FLT3) cells after treatment with 7d for 24 hours. Whereas even subnanomolar concentrations of 7d induced caspase activation in MV4-11, K562 cells were much less sensitive and required vastly greater concentrations for caspase induction (Figure 3C).



Figure 2. Effect of 7d on FLT3 and some of its downstream signaling pathways.



Figure 3. Effect of 7d on cell cycle (A) and apoptosis (B, C) in the MV4-11 and K562 cell lines.

Activity in MV4-11 xenograft

To determine the efficacy of compound **7d** *in vivo*, we compared its effects to that of quizartinib using human tumor xenografts grown in immunocompromised mice. First, we determined that treatment

Journal of Medicinal Chemistry

with **7d** caused no gross toxicity in rats (at doses up to 100 mg/kg i.v. or p.o.). Next, a single dose of 10 mg/kg of **7d** or quizartinib was administered i.p. to mice with subcutaneously implanted MV4-11 xenografts. Control mice were injected with an equal volume of diluent alone. Tumors were harvested at 4 post-treatment time points: 2, 24, 36, and 48 hours after **7d**, quizartinib, or vehicle injection. The protein lysates were analyzed to detect phosphorylation of the target oncogenic tyrosine kinase FLT3-ITD and its downstream signaling molecules (Figure 4, Figure S1). Compound **7d** effectively inhibited FLT3-ITD autophosphorylation in MV4-11 xenografts (Figure 4A), and unlike quizartinib (Figure 4B),¹⁹⁻²¹ it sustained this inhibition of phosphorylation at all analyzed time-points. Next, we investigated the inhibition of the key downstream effectors of FLT3-ITD, namely p-STAT5 and p-ERK1/2 (Figure 4A, B). Treatment with **7d** reduced STAT5 phosphorylation by over 95% after 24 hours, which was a slightly stronger effect than that of quizartinib (Figure S1). Mirroring the results observed for p-FLT3, the suppression of p-STAT5 phosphorylation induced by **7d** was sustained over 48 hours (Figure 4A), whereas a rebound in STAT5 phosphorylation was detected in lysates from quizartinib-treated tumors (Figure 4B).

In contrast to the results observed for p-STAT5, p-ERK1/2 was only transiently inhibited in the tumor tissue, exhibiting similar rebound kinetics for both tested inhibitors in all animals (Figure 4A, B). Two hours after treatment with **7d** or quizartinib, the suppression of ERK1/2 was reduced by 95% relative to controls (Figure S1). However, its phosphorylation was restored within 24 hours of treatment with either compound, suggesting that there is an adaptive feedback mechanism capable of ERK reactivation in response to FLT3-ITD inhibition. Similar behavior was observed in earlier studies using quizartinib²⁰ and sorafenib.²²

Journal of Medicinal Chemistry



Figure 4. Compound **7d** induces sustained suppression of FLT3-ITD signaling in MV4-11 xenograft tumors. Subcutaneous mouse xenografts were treated with 10 mg/kg **7d** (**A**) or quizartinib (**B**), and the phosphorylation status of FLT3 and its downstream signaling molecules was analyzed by immunoblotting at the indicated times. GAPDH was used as a control for protein loading. Each line represents a separate animal.

Conclusion

We have presented the synthesis of a new generation of highly potent FLT3 inhibitors with a 2,6,9trisubstutituted purine scaffold. A focused library of 49 compounds was prepared, some members of which exhibited selective nanomolar activity against acute myeloid leukemia cell lines expressing an oncogenic variant of FLT3. The lead compound **7d** inhibited FLT3 autophosphorylation and deactivated its downstream signaling pathways, leading to cell cycle arrest and apoptosis in MV4-11 cells. Docking of **7d** to FLT3 suggests a type I binding mode and explains the structural determinants of its potency. Experiments with subcutaneously implanted MV4-11 xenografts confirmed that a single dose of the tested compound induced sustained inhibition of FLT3 *in vivo*. In conclusion, we suggest this series to be followed for development of potent and specific FLT3 inhibitors for use as drug candidates for treating AML.

Experimental Section

Reagents and General Methods

Chemistry

Melting points were determined on Büchi Melting Point B-540 apparatus and are uncorrected. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Jeol 500 ECA instrument operating at 500 MHz for ¹H and 126 MHz for ¹³C or on a Bruker Avance 300 spectrometer (300 MHz) at ambient temperature in DMSO-d6 or $CDCl_3$. Chemical shifts are reported in ppm. Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz), and the following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (qui), sextet (sex), septet (sep), multiplet (m). Mass spectra were recorded using an LCQ ion trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA). The chromatographic purity of the compounds was determined using HPLC-DAD-MS. An Alliance 2695 separations module (Waters) linked simultaneously to a PDA 996 (Waters) and a Q-Tof micro (Waters) benchtop quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer were used. Samples were dissolved in methanol and diluted to a concentration of 10 μ g·mL⁻¹ in the mobile phase (initial conditions). Then, 10 μ L of the solution were injected on a RP-column (150 mm × 2.1 mm; 3.5 µm; Symmetry C18, Waters). The column was kept in a thermostat at 25 °C. Solvent (A) consisted of 15 mM formic acid adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide. Methanol was used as the organic modifier (solvent B). At flow rate of 0.2 mL·min⁻¹, the following binary gradient was used: 0 min, 10% B; 0–24 min, a linear gradient to 90% B, followed by 10 min isocratic elution of 90% B. At the end of the gradient, the column was reequilibrated to the initial conditions for 10 min. The effluent was introduced into the DAD (scanning range 210-400 nm, with 1.2 nm resolution) and an electrospray source was applied (source temperature 110 °C, capillary voltage +3.0 kV, cone voltage +20 V, desolvation temperature 250 °C). Nitrogen was used as both the desolvation gas (500 $L \cdot h^{-1}$) and the cone gas (50 $L \cdot h^{-1}$). The mass spectrometer was operated in positive (ESI+) ionization mode, and data were acquired in the 50-1000 m/z range. Elemental analyses were performed using an EA1112 CHN analyser (Thermo Finnigan); the results obtained for C, H, and N were within acceptable limits of the expected values. Merck silica

Journal of Medicinal Chemistry

gel Kieselgel 60 (230–400 mesh) was used for column chromatography. The purity of biologically evaluated compounds was >95% as determined by HPLC-DAD-MS and elemental analysis.

General procedure for the preparation of derivatives 4

4-Fluoronitrobenzene (2a) or 5-bromo-2-nitropyridine (2b) (1.00 mmol), the appropriate secondary amine (1.05 mmol), and potassium carbonate (2.00 mmol) in ethanol (10 mL) were heated under an argon atmosphere in a sealed tube at 100 °C for 4 hours. The completion of the reaction was checked with TLC on silica (chloroform-methanol, 19:1). After cooling to room temperature, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was partitioned between dichloromethane (25 mL) and water (25 mL). The water phase was extracted twice with dichloromethane (25 mL). The combined organic phases were washed with water, brine, dried over sodium sulphate, and concentrated under reduced pressure. The crude product (3) was **then used directly** without **further** purification.

The crude product (3) from **the** previous step (0.75 mmol) was hydrogenated under atmospheric pressure in methanol (50 mL) with 5% wt. palladium on a charcoal (50 mg). After consumption of hydrogen, the reaction mixture was filtered through celite, washed with methanol and evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in 2 M hydrochloric acid (50 mL) and extracted with dichloromethane (25 mL). The water phase was neutralised with 5 % sodium hydrogen carbonate, then the precipitate was filtered off and washed with water. The crude product was dried in a vacuum dessicator.

4-(5-Nitro-pyridin-2-yl)-morpholine (3a)

Yield: 85%. Elemental analysis: Calcd.for C₉H₁₁N₃O₃ (209.21): C, 51.67; H, 5.30; N, 20.09. Found: C, 51.57; H, 5.48; N, 19.74. HPLC-MS (ESI+): 210.31 (99.8%). GC-MS (EI, M+ (rel.int. m/z)): 209 (18), 124 (100), 87 (28). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.92-2.98 (m, 4H), 3.71-3.75 (m, 4H), 6.52 (d, *J* = 9.5, 1H), 8.15 (s, 1H), 9.02 (d, *J* = 9.5, 1H).

6-(4-Nitro-phenyl)-2-oxa-6-aza-spiro[3.3]heptane (3b)

Yield: 72%. Elemental analysis: Calcd.for C₁₁H₁₂N₂O₃ (220.22): C, 59.99; H, 5.49; N, 12.72. Found:
C, 59.66; H, 5.12; N, 12.19. HPLC-MS (ESI+): 221.36 (99.7%). GC-MS (EI, M+ (rel.int. m/z)): 220
(21), 150 (100), 120 (57). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 4.19-4.21(m, 4H), 4.70-4.72 (m, 4H), 6.44 (d, *J*=9.15, 2H), 8.04 (d, *J* 9.15, 2H).

6-Morpholin-4-yl-pyridin-3-ylamine (4a)

Yield: 98%. Elemental analysis: Calcd.for C₉H₁₃N₃O (179.22): C, 60.32; H, 7.31; N, 23.45. Found: C, 59.96; H, 6.83; N, 23.19. HPLC-MS (ESI+): 180.28 (99.8%). GC-MS (EI, M+ (rel.int. m/z)): 179 (22), 124 (100). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.05 (s(br, 2H), 3.30-3.34 (m, 4H), 3.79-3.82 (m, 4H), 6.55 (d, *J* = 8.5, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.5, 1H).

4-(2-Oxa-6-aza-spiro[3.3]hept-6-yl)-phenylamine (4b)

Yield: 58%. Elemental analysis: Calcd.for C₁₁H₁₄N₂O (190.24): C, 69.45; H, 7.42; N, 14.73. Found: C, 69.13; H, 7.12; N, 14.96. HPLC-MS (ESI+): 191.5 (99.7%). GC-MS (EI, M+ (rel.int. m/z): 190 (11), 132 (100). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.72-3.75(m, 4H), 4.40 (s (br), 2H), 4.65-4.68 (m, 4H), 6.21 (d, *J*= 8.16, 2H), 6.46 (d, *J*= 8.15, 2H)

General procedure for the preparation of compounds 5a – 5m:

To a suspension of 9-cyclopentyl-2,6-dichloro-9*H*-purine (13) (1.98 mmol) in a mixture of n-propanol (10 mL) and *N*,*N*-diisopropyl-*N*-ethylamine (8.72 mmol), appropriate amine (2.18 mmol) was added. The suspension was heated with stirring in a sealed tube under an argon atmosphere at 100 °C for 2-6 hours. The reaction was checked by TLC. After completion of the reaction, the reaction mixture was cooled to room temperature and evaporated under reduced pressure. The residue was partitioned between water (50 mL) and dichloromethane (50 mL), and the water phase was extracted two times more with the same volume of dichloromethane. The combined organic phases were washed with water and brine and evaporated under reduced pressure. The crude product was crystallized from petroleum ether:ethyl acetate 3:1.

Journal of Medicinal Chemistry

4-(Bromo-phenyl)-(2-chloro-9-isopropyl-9H-purin-6-yl)-amine (5a)

Yield: 89 % m.p.: 154-156 °C. Elemental analysis: Calcd.for $C_{14}H_{13}BrClN_5$ (366.64): C, 45.86; H, 3.57; N, 19.10. Found: C, 45.94; H, 3.81; N, 18.82. HPLC-MS (ESI+): 367.6 (97.8%). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.49 (d, *J*=7.0, 6H), 4.70 (sep, *J*=7.0, 1H), 7.49 (d, *J*=9.00, 2H), 7.80 (d, *J*=9.00, 2H), 8.44 (s, 1H), 10.39 (s, 1H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ ppm 22.63, 47.49, 115.61, 119.74, 123.45, 131.84, 137.88, 141.17, 150.92, 152.38, 152.69.

4-(Bromo-phenyl)-(2-chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-amine (5b)

Yield: 85 % m.p.: 193-194 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₁₆H₁₅BrClN₅ (392.69): C, 48.94; H, 3.85; N, 17.83. Found: C, 49.06; H, 3.94; N, 17.49. HPLC-MS (ESI+): 393.7 (98.4%). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.87-1.92 (m, 2H), 1.92-1.99 (m, 4H), 2.01-2.23 (m, 2H), 4.85 (qui, *J*=7.17, 1H), 7.54 (d, *J*=8.73, 2H), 7.84 (d, *J*=8.73, 2H), 8.45 (s, 1H), 10.42 (s, 1H).

(2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-chloro-phenyl)-amine (5c)

Yield: 78 % m.p.: 212-214 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₁₆H₁₅Cl₂N₅ (348.24): C, 55.19; H, 4.34; N, 20.11. Found: C, 55.56; H, 4.05; N, 19.89. HPLC-MS (ESI+): 349.4 (96.4%). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.67-1.71(m, 2H), 1.72-1.76(m, 4H), 1.89-2.20 (m, 2H), 4.84 (sep, *J*= 7.17, 1H), 7.40 (d, *J*= 8.85, 2H), 7.89(d, *J*= 8.85, 2H), 8,44 (s, 1H), 10.43 (s, 1H).

(9-Benzyl-2-chloro-9H-purin-6-yl)-(4-bromo-phenyl)-amine (5d)

Yield: 54 % m.p.: 231-233 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₁₈H₁₃BrClN₅ (414.69): C, 52.13; H, 3.16; N, 16.89. Found: C, 52.02; H, 3.45; N, 16.93. HPLC-MS (ESI+): 415.8 (97.8%). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.53 (s, 2H), 7.31-7.42 (m, 5H), 7.56 (d, *J*=8.43, 2H), 8.03 (d, *J*=8.43, 2H), 8.87 (s, 1H), 9.25 (s(br), 1H).

(9-Benzyl-2-chloro-9H-purin-6-yl)-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-amine (5e)

Yield: 76 %. m.p.: 194-196 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₃H₂₃ClN₆O (434.93): C, 63.52; H, 5.33; N, 19.32. Found: C, 63.82; H, 5.12; N, 19.01. HPLC-MS (ESI+): 435.9 (96.2%). ¹H-NMR (300

MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.35-2.41 (m, 4H), 3.43 (s, 2H), 3.60 (t, *J*=7.85, 4H), 5.41 (s, 2H), 7.26-7.37 (m, 7H), 7.76 (d, *J*=8.40, 2H), 8.43 (s, 1H), 10.34 (s, 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 46.95, 53.64, 62.51, 66.69, 119.26, 121.68, 127.98, 128.43, 129.34, 129.69, 133.32, 137.09, 138.11, 142.85, 151.23, 152.94, 153.08.

(4-Bromo-phenyl)-[2-chloro-9-(tetrahydro-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl]-amine (5f)

Yield: 76 %. m.p.: 143-144 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₁₆H₁₅BrClN₅O (408.69): C, 47.02; H, 3.70; N, 17.14. Found: C, 47.13; H, 3.44; N, 17.11. HPLC-MS ESI+): 410.2 (97.5%). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.55-1.58(m, 2H), 1.73-1.76 (m, 1H), 1.95-1.99 (m, 2H), 2.20 (t, *J*=5.3, 1H), 3.67-3.75 (m, 1H), 4.00 (d, *J*=5.3, 1H), 5.63 (d, *J*=10.71, 1H), 7.54 (d, *J*=8.79, 2H), 7.82 (d, *J*=8.79, 2H), 8.58 (s, 1H), 10.49 (s(br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.19, 24.39, 29.81, 67.61, 80.90, 115.19, 118.78, 122.95, 131.25, 138.09, 140.53, 150.22, 152.09, 152.34

(2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-pyrrolidin-1-yl-phenyl)-amine (5g)

Yield: 92%. m.p.: 168-169 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₀H₂₃ClN₆ (382.89): C, 62.74; H, 6.05; N, 21.95. Found: C, 62.54; H, 5.82; N, 21.83. HPLC-MS (ESI+): 384 (99.9%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.63-1.81(m, 2H), 1.86-1.99 (m, 8H), 2.14-2.21 (m, 2H), 3.19-3.23 (m, 4H), 4.81 (qui, *J*=7.17, 1H), 6.49 (d, *J*=8.73, 2H), 7.49 (d, *J*=8.73, 2H), 8.28 (s, 1H), 9.89(s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.03, 25.47, 32.57, 48.02, 55.97, 111.85, 119.27, 123.95, 127.55, 140.56, 145.38, 150.70, 152.90, 153.19.

(2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-morpholin-4-yl-phenyl)-amine (5h)

Yield: 72%. m.p.: 145-148 °C. Elemental analysis: Calcd.for $C_{20}H_{23}CIN_6O$ (398.89): C, 60.22; H, 5.81; N, 21.07. Found: C, 60.25; H, 5.88; N, 21.19. HPLC-MS (ESI+): 400.7 (98.5%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.79-1.83 (m, 2H), 1.85-1.96 (m, 4H), 2.27-2.36 (m, 2H), 3.14-3.18 (m, 4H), 3.88-3.90 (m, 4H), 4.94 (qui, *J*=7.32, 1H), 6.97 (d, *J*=8.94, 2H), 7.65 (d, *J*=8.94, 2H), 7.80 (s (br), 1H), 7.83 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 23.91, 33.04, 49.89, 55.97, 66.96, 116.54, 119.28, 121.89, 130.84, 138.78, 148.11, 150.70, 152.48, 154.03.

ACS Paragon Plus Environment

2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-amine (5i)

Yield: 82%. m.p.: 128-131 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₂H₂₈ClN₇ (425.96): C, 62.03; H, 6.63; N, 23.02. Found: C, 61.93; H, 6.79; N, 23.22. HPLC-MS (ESI+): 427.3 (99.5%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.16 (t, *J*=7.2, 3H), 1.65-1.68 (m, 2H), 1.83-1.95 (m, 4H), 2.26-2.32 (m, 2H), 3.05-3.11 (m, 4H), 3.27-3.35 (m, 4H), 4.78 (qui, *J*=6.9, 1H), 6.89 (d, *J*=9.00, 2H), 7.57 (d, *J*=9.00, 2H), 8.32 (s, 1H), 10.02 (s, 1H). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 11.27, 24.24, 24.45, 32.19, 32.32, 54.84, 55.48, 63.33, 113.59, 114.68, 122.36, 131.50, 137.37, 140.41, 152.24, 159.16.

(2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-amine (5j)

Yield: 69%. m.p.: 123-124 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₁H₂₅ClN₆O (412.92): C, 61.08; H, 6.10; N, 20.35. Found: C, 61.33; H, 5.99; N, 20.02. HPLC-MS (ESI+): 414.2 (99.5%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.78-1.82 (m, 2H), 1.84-1.99 (m, 4H), 2.28-2.36 (m, 2H), 2.47-2.52 (m, 4H), 3.53 (s, 2H), 3.70-3.74 (m, 4H), 4.95 (qui, *J*=5.4, 1H), 7.37(d, *J*=8.22, 2H), 7.74 (d, *J*=8.22, 2H), 7.86 (s, 1H). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 23.93, 33.04, 53.51, 56.04, 62.92, 67.06, 119.52, 120.01, 129.42, 132.12, 137.29, 139.07, 150.87, 152.30, 153.87.

2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-[4-(2-oxa-6-aza-spiro[3.3]hept-6-yl)-phenyl]-amine (5k)

Yield: 74%. m.p.: 119-120 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₁H₂₃ClN₆O (410.90): C, 61.38; H, 5.64; N, 20.45. Found: C, 61.14; H, 5.39; N, 20.19. HPLC-MS (ESI+): 411.9 (97.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.67-1.72 (m, 2H), 1.84-1.99 (m, 4H), 2.11-2.18 (m, 2H), 3.92-3.94 (m, 4H), 4.70-4.72(m, 4H), , 4.81 (qui, *J*= 5.4, 1H), 6.43 (d, *J*=8.70, 2H), 7.53 (d, *J*=8.70, 2H), 8.33 (s, 1H), 9.99 (s, 1H).

[4-(4-Benzyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-(2-chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-amine (51)

Yield: 79 %. m.p. 181-182 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₇H₃₀ClN₇ (488.03): C, 66.45; H, 6.20; N, 20.09. Found: C, 66.71; H, 6.41; N, 19.84. HPLC-MS (ESI+): 490.6 (99.9%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm 1.62-1.70 (m, 2H), 1.79-1.86 (m, 2H), 1.89-1.97 (m, 2H), 2.10-2.16 (m, 2H), 3.06-

3.09 (m, 4H), 3.29-3.31 (m, 4H), 3.49 (s, 2H), 4.78 (qui, *J*=7.5, 1H), 6.88 (d, *J*=9.0, 2H), 7.21-7.25 (m, 1H), 7.27-7.31 (m, 4H), 7.57 (d, *J*=9.0, 2H), 8.32 (s, 1H), 10.03 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.03, 32.56, 49.14, 53.09, 56.01, 62.60, 115.99, 119.38, 123.13, 127.51, 128.74, 129.46, 130.91, 138.61, 140.84, 148.10, 150.85, 152.76, 152.99.

2-Chloro-9-cyclopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-morpholin-4-yl-pyridin-3-yl)-amine (5m)

Yield: 88%. m.p. 113-115 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₁₉H₂₂ClN₇O (399.88): C, 57.07; H, 5.55; N, 24.52. Found: C, 57.23; H, 5.21; N, 24.14. HPLC-MS (ESI+): 400.9 (99.5%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.79-1.83 (m, 2H), 1.85-1.96 (m, 4H), 2.27-2.36 (m, 2H), 3.14-3.18 (m, 2H), 3.88-3.90 (m, 2H), 4.91 (qui, *J*=6.55, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.41-7.47 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.25 (s(br), 1H).

General procedure for the preparation of compounds 6a-6o, 7a-7f and 8a-8o:

The mixture of 2-chloro-9-cyclopentyl-9*H*-purin-6-subst.amino derivative 15 (1.00 mmol) and trans-1,4-diaminocyclohexane (10.0 mmol) in 1,2-ethandiole (5,0 mL) was heated with stirring at 160 °C for 4 hours in an argon atmosphere. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with ethyl acetate (40 mL) and washed with water (40 mL). The organic phase was washed with brine, dried over sodium sulphate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica using mobile phase chloroform – methanol (4:1, v/v).

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)- N^6 -(4-bromo-phenyl)-9-isopropyl-9H-purine-2,6-diamine (6a)

Yield: 85 %. m.p.: 224-226 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{20}H_{26}BrN_7$ (444.37): C, 54.06; H, 5.90; N, 22.06. Found: C, 53.99; H, 5.73; N, 22.23. HPLC-MS (ESI+): 446.0 (97.9%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.07 – 1.29 (m, 4H), 1.45 (d, *J* = 6.4, 6H), 1.77 (d, *J* = 11.8, 2H), 1.93 (d, *J* = 11.5, 2H), 3.64 – 3.52 (m, 2H), 4.59 – 4.49 (sep, *J*=6.50, 1H), 6.47 (s(br), 1H), 7.39 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.99(d, *J*=8.7, 2H), 9.55 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.57, 31.84, 35.76, 46.29, 50.56, 113.53, 114.40, 122.17, 131.42, 136.69, 140.54, 152.20, 158.59.

1-[6-(4-Bromo-phenylamino)-9-isopropyl-9H-purin-2-ylamino]-propan-2-ol (6b)

Journal of Medicinal Chemistry

Yield: 79 %. m.p.: 178-180 °C. Elemental analysis: Calcd. For $C_{17}H_{21}BrN_6O$ (405.30): C, 50.38; H, 5.22; N, 20.74. Found: C, 50.59; H, 5.49; N, 20.58. HPLC-MS (ESI+): 407.0 (98.1%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.06 (d, J = 6.2, 3H), 1.46 (d, J = 6.8, 6H), 3.20 – 3.12 (m, 1H), 3.30 – 3.23 (m, 2H), 3.81(sep, J = 5.5, 1H), 4.55 (sep, J = 7.0, 1H), 4.70 (s, 1H), 6.50 (t, J = 5.8, 1H), 7.39 (d, J = 8.9, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.97 (d, J = 8.7, 2H), 9.55 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.93, 22.56, 46.40, 49.82, 65.92, 113.66, 114.68, 122.40, 131.49, 136.78, 140.38, 151.87, 152.24, 159.30.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)- N^6 -(4-bromo-phenyl)-9-cyclopentyl-9*H*-purine-2,6-diamine (6c)

Yield: 79 %. m.p.: 162-164 °C. Elemental analysis: Calcd. For $C_{22}H_{28}BrN_7$ (470.42): C, 56.17; H, 6.00; N, 20.84. Found: C, 56.39; H, 5.63; N, 20.51. HPLC-MS (ESI+): 473.0 (99.8%). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.09-1.32 (m, 4H), 1.64-1.68 (m, 2H), 1.78-2.08 (m, 12H), 2.57 (m, 1H), 3.58-3.61 (m, 1H), 4.69 (qui, *J*=7.11, 1H), 6.50 (d, *J*=7.41, 1H), 7.42 (d, *J*=8.85, 2H), 7.90 (s, 1H), 8.04 (d, *J*=8.85, 2H), 9.58 (s (br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.18, 24.48, 31.77, 32.28, 35.67, 49.12, 50.63, 133.53, 122.22, 123.80, 131.42, 137.46, 140.55, 150.85, 152.26, 158.52.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)- N^6 -(4-chloro-phenyl)-9-cyclopentyl-9*H*-purine-2,6-diamine (6d)

Yield: 84 % m.p.: 113-115 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₂₂H₂₈ClN₇ (425.96): C, 62.03; H, 6.63; N, 23.02. Found: C, 61.87; H, 6.89 N, 21.31. HPLC-MS (ESI+): 426.2 (98.7%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.29–1.04 (m, 4H), 1.68–1.56 (m, 2H), 2.11 – 1.72(m, 10H), 2.56–2.48 (m, 1H), 3.62 – 3.52 (m, 1H), 4.65 (qui, *J* = 6.3, 1H), 6.48 (d, *J* = 4.9, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.87 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.54 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.29, 31.77, 32.28, 35.67, 50.56, 50.78, 55.50, 114.48, 121.80, 125.55, 128.51, 137.40, 140.13, 152.27, 158.52.

1-[6-(4-Chloro-phenylamino)-9-cyclopentyl-9H-purin-2-ylamino]-propan-2-ol (6e)

Yield: 79 % m.p.: 128-129 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{19H23}CIN_6O$ (386.88): C, 58.99; H, 5.99; N, 21.72. Found: C, 58.63; H, 6.22 N, 21.94. HPLC-MS (ESI+): 387.3 (98.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.09 (d, *J*= 6.18, 3H), 1.63-1.67 (m, 2H), 1.87-2.00 (m, 4H), 2.09-2.21 (m,

2H), 3.14-3.22 (m, 2H), 3.75-3.89 (m, 1H), 4.67 (sep, J=7.41, 1H), 4.72 (s(br), 1H), 6.54 (t, J=5.19, 1H), 7.30 (d, J = 8.67, 2H), 7.89 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.67, 2H), 9.58 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 76 MHz) δ ppm 21.29, 23.63, 31.66, 49.20, 54.81, 65.28, 114.12, 121.36, 125.07, 127.96, 136.74, 139.33, 151.67, 158.67.

1-[6-(4-Bromo-phenylamino)-9-cyclopentyl-9H-purin-2-ylamino]-propan-2-ol (6f)

Yield: 94 %. m.p.: 133-134 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₁₉H₂₃BrN₆O (431.33): C, 52.91; H, 5.37; N, 19.48. Found: C, 52.84; H, 5.19 N, 19.56. HPLC-MS (ESI+): 433.0 (98.0%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.05 (d, J= 6.23, 3H), 1.62-1.67 (m, 2H), 1.80-1.86 (m, 2H), 1.92-1.97 (m, 2H), 2.04-2.09 (m, 2H), 3.11-3.17 (m, 1H), 3.25-3.29 (m, 1H), 3.81 (sep, J=5.8, 1H), 4.63-4.68 (m, 2H), 6.51 (t, J= 5.28, 1H), 7.39 (d, J= 8.85, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.99 (d, J=8.85, 2H), 9.56 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 126 MHz) δ ppm 21.95, 24.27, 32.31, 49.83, 55.42, 60.25, 65.88, 113.64, 114.78, 122.43, 131.48, 137.40, 140.41, 152.28, 159.27.

(R)-3-[6-(4-Bromo-phenylamino)-9-cyclopentyl-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-1-ol (6g)

Yield: 85 %. m.p.: 156-158 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₂₀H₂₅BrN₆O (445.36): C, 53.94; H, 5.66; N, 18.87. Found: C, 53.67; H, 5.49 N, 18.41. HPLC-MS (ESI+): 447.07 (97.2%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.86 (t, J = 7.4, 3H), 1.46 (qui, J = 7.0, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 3H), 1.88 – 1.79 (m, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 2H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 3.83 – 3.74 (m, 1H), 4.60 (t, J = 5.2, 1H, 4.66 (qui, J = 7.7, 1H), 6.23 (d, J = 8.1, 1H), 7.39 (d, J = 8.9, 2H), 7.88 (s,1H), 7.98 (d, J = 8.9, 2H), 7.98 (d, J 7.7, 2H), 9.52 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11.26, 24.24, 24.44, 32.19, 32.31, 54.84, 55.47, 63.32, 113.59, 114.67, 122.35, 131.49, 137.37, 140.41, 152.24, 159.15.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-benzyl- N^6 -(4-bromo-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine (6h)

Yield: 82 %. m.p.: 129-131 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₂₄H₂₆BrN₇ (492.41): C, 58.54; H, 5.32; N, 19.91. Found: C, 58.66; H, 5.39 N, 19.82. HPLC-MS (ESI+): 493.5 (98.1%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_0 δ ppm 1.15-1.26 (m, 4H), 1.80 (d, J=9.0, 2H), 1.92 (d, J=9.0, 2H), 2.57-2.63 (m, 1H),

Journal of Medicinal Chemistry

3.55-3.62 (m, 1H), 5.19 (s, 2H), 6.60 (s(br), 1H), 7.23-7.32 (m, 5H), 7.39 (d, *J*=8.0, 2H), 7.94 (s, 1H), 8.00 (d, *J*=8.0, 2H), 9.67 (s(br), 1H).

1-[9-Benzyl-6-(4-bromo-phenylamino)-9H-purin-2-ylamino]-propan-2-ol (6i)

Yield: 96 % m.p.: 148-149 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{21}H_{21}BrN_6O$ (453.34): C, 55.64; H, 4.67; N, 18.54. Found: C, 55.41; H, 5.02 N, 18.20. HPLC-MS (ESI+): 454.5 (97.8%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.08 (d, *J*=6.21, 3H), 3.13-3.22 (m, 2H), 3.81 (sep, *J*=5.37, 1H), 4.67 (d, *J*=5.26, 1H), 5.24 (s, 2H), 6.61 (t, *J*=5.46, 1H), 7.24-7.44 (m, 5H), 7.42 (d, *J*=8.91, 2H), 7.98 (s, 1H), 8.01 (d, *J*=8.91, 2H), 9.64 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.92, 46.27, 49.84, 65.80, 113.74, 114.21, 122.48, 128.16, 129.15, 131.49, 137.89, 138.74, 140.33, 152.30, 159.69.

(9-Benzyl-2-morpholin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-bromo-phenyl)-amine (6j)

Yield: 87 % m.p.: 171-172 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{22}H_{21}BrN_6O$ (465.36): C, 56.78; H, 4.55; N, 18.06. Found: C, 56.53; H, 4.71 N, 17.83. HPLC-MS (ESI+): 466.5 (97.6%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.63-3.68 (m, 8H), 5.28 (s, 2H), 7.28-7.36 (m, 5H), 7.47 (d, *J*=8.82, 2H), 7.84 (d, *J*=8.82, 2H), 8.07 (s, 1H), 9.79 (s, 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 44.77, 45.77, 65.94, 113.52, 113.76, 122.22, 127.61, 127.71, 128.56, 131.01, 137.16, 139.02, 139.22, 151.33, 158.44.

[9-Benzyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-bromo-phenyl)-amine (6k)

Yield: 88 % m.p.: 162-164 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{23}H_{26}BrN_7$ (480.40): C, 57.50; H, 5.46; N, 20.41. Found: C, 57.38; H, 5.14 N, 20.11. HPLC-MS (ESI+): 481.8 (96.2%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.17 (s, 3H), 2.32-2.36 (m, 4H), 3.69-3.72 (m, 4H), 5.26 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H), 7.47 (d, *J*=8.79, 2H), 7.85 (d, *J*=8.79, 2H), 8.03 (s, 1H), 9.76 (s (br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 44.16, 45.78, 54.37, 113.45, 113.54, 122.11, 127.57, 127.69, 128.52, 130.98, 137.16, 138.80, 139.30, 151.31, 151.74, 158.35.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)- N^6 -(4-bromo-phenyl)-9-(tetrahydro-pyran-2-yl)-9H-purine-2,6-diamine (6l)

Yield: 94 % m.p.: 114-115 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₂₂H₂₈BrN₇O (486.41): C, 54.32; H, 5.80; N, 20.16. Found: C, 54.38; H, 5.91 N, 19.84. HPLC-MS (ESI+): 488.3 (98.1%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.30 – 1.13 (m, 4H), 1.56 – 1.48 (m, 2H), 1.68 – 1.59 (m, 1H), 1.78 (d, J = 11.3, 2H), 1.97 – 1.82 (m, 3H), 2.58 – 2.49 (m, 1H), 3.63 – 3.52 (m, 1H), 3.96 (d, J = 12.4, 1H), 5.40 (d, J = 10.7, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.40 (d, J = 8.6, 2H), 8.05 – 7.94 (m, 3H), 9.64 (s (br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 23.21, 25.10, 30.46, 31.75, 35.33, 50.46, 50.97, 68.18, 80.97, 80.97, 113.70, 113.82, 122.22, 131.44, 136.67, 140.40, 152.21, 158.91.

1-[6-(4-Bromo-phenylamino)-9-(tetrahydro-pyran-2-yl)-9H-purin-2-ylamino]-propan-2-ol (6m)

Yield: 79 %. m.p.: 127-128 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{19}H_{23}BrN_6O_2$ (447.33): C, 51.01; H, 5.18; N, 18.79. Found: C, 51.12; H, 5.26 N, 18.57. HPLC-MS (ESI+): 449.2 (98.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.09 (d, J=6.15, 3H), 1.54-1.58 (m, 2H), 1.63-1.70 (m, 1H), 1.88-1.95 (m, 2H), 2.21-2.28 (m, 1H), 3.15-3.26 (m, 2H), 3.62-3.66 (m, 1H), 3.84 (sep, J=5.7, 1H), 3.98-4.02 (m, 1H), 4.71 (t, J=10.26, 1H), 5.47 (d, J=10.02, 1H), 6.62 (t, J=5.34, 1H), 7.43 (d, J=8.79, 2H), 8.06 (s, 1H), 9.64 (s(br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.30, 22.53, 24.48, 29.91, 49.24, 54.82, 65.27, 67.53, 80.33, 113.18, 113.50, 121.87, 130.87, 136.10, 139.64, 151.65, 159.02.

(4-Bromo-phenyl)-[2-morpholin-4-yl-9-(tetrahydro-pyran-2-yl)-9H-purin-6-yl]-amine (6n)

Yield: 72 %. m.p.: 133-134 °C. Elemental analysis: Calcd. for $C_{20}H_{23}BrN_6O_2$ (459.34): C, 52.30; H, 5.05; N, 18.30. Found: C, 51.87; H, 4.91 N, 17.94. HPLC-MS (ESI+): 461.0 (97.2%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.52-1.56 (m, 2H), 1.67-1.71 (m, 1H), 1.89-1.97 (m, 2H), 2.18-2.29 (m, 1H), 3.64-3.69 (m, 9H), 3.99 (d, *J*=11.43, 1H), 5.53 (d, *J*=10.05, 1H), 7.48 (d, *J*=8.76, 2H), 7.85 (d, *J*=8.76, 2H), 8,15 (s, 1H), 9.80 (s (br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.47, 24.51, 30.00, 44.73, 66.00, 67.53, 80.33, 113.56, 122.22, 131.01, 137.09, 139.17, 151.14, 151.32, 158.32.

(4-Bromo-phenyl)-[2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9-(tetrahydro-pyran-2-yl)-*9H*-purin-6-yl]-amine (60)

Journal of Medicinal Chemistry

Yield: 95 %. m.p.: 169-171 °C. Elemental analysis: Calcd. for C₂₁H₂₆BrN₇O (472.38): C, 53.39; H, 5.55; N, 20.76. Found: C, 53.61; H, 5.28 N, 20.49. HPLC-MS (ESI+): 473.5 (99.1%). ¹H NMR (DMSO- d_6) δ ppm 1.53-1.56 (m, 2H), 1.63-1.72 (m, 1H), 1.88-1.92 (m, 2H), 2.18-2.22 (m, 4H), 2.33-2.38 (m, 4H), 3.65-3.72 (m, 5H), 3.98 (d, *J*=11.22, 1H), 5.56 (d, *J*=6.54, 1H), 7.48 (d, *J*=8.58, 2H), 7.84 (d, *J*=8.58, 2H), 8.13 (s, 1H), 9.76 (s(br), 1H). ¹³C-NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 22.46, 24.51, 30.06, 44.10, 45.79, 54.46, 67.51, 80.23, 113.44, 122.12, 131.00, 136.90, 139.24, 151.22, 158.26.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-pyrrolidin-1-yl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine (7a)

Yield: 92%. m.p.: 216-217 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₆H₃₆N₈ (460.62): C, 67.80; H, 7.88; N, 24.33. Found: C, 67.71; H, 7.49; N, 24.01. HPLC-MS (ESI+): 461.7 (99.6%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.17-1.38 (m, 2H), 1.74-2.06 (m, 14H), 2.20-2.24 (m, 4H), 2.75 (sep, *J*=4.26, 1H), 3.27-3.31 (m, 4H), 3.81 (sex, *J*=5.97, 1H), 4.69-4.79 (m, 2H), 6.56 (d, *J*=8.73, 2H), 7.36 (s(br), 1H), 7.52 (s, 1H), 7.58 (d, *J*=8.73, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.38, 24.51, 25.42, 31.84, 32.31, 35.78, 48.12, 50.57, 53.14, 55.10, 111.81, 121.34, 122.41, 123.09, 129.84, 136.51, 144.22, 152.67, 158.74.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-yl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine (7b)

Yield: 88 %. m.p.: 189-191 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₆H₃₆N₈O (476.62): C, 65.52; H, 7.61; N, 23.51. Found: C, 65.23; H, 7.58; N, 23.11. HPLC-MS (ESI+): 476.9 (99.0%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.05 – 0.97 (m, 4H), 1.73 – 1.60 (m, 2H), 1.88 – 1.78 (m, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 2H), 2.19 – 2.08 (m, 2H), 2.33 (dd, J = 13.8, J' = 6.8, 2H), 3.07 (d, J = 3.2, 4H), 3.31 (s, 3H), 3.45 – 3.36 (m, 1H), 4.37 – 4.30 (m, 1H), 4.78 (p, J = 7.4, 1H), 6.89 (d, J = 8.4, 2H), 7.57 (d, J = 8.1, 2H), 8.32 (s, 1H), 10.02 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.52, 19.10, 24.03, 32.56, 49.08, 52.17, 52.88, 56.02, 56.55, 115.90, 119.39, 123.15, 130.87, 140.83, 148.13, 150.86, 152.78, 153.01.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-9H-purine-2,6diamine (7c)

Yield: 76 %. m.p.: 105-108°C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₈H₄₁N₉ (503.70): C, 66.77; H, 8.20; N, 25.03. Found: C, 66.84; H, 8.02; N, 25.32. HPLC-MS (ESI+): 504.8 (98.4%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.16 (t, *J*=7.20, 3H,), 1.23-1.44 (m, 4H), 1.76-2.32 (m, 14H), 2.48 (q, *J*=7.20, 2H), 2.60-2.66 (m, 4H), 2.85 (m, 1H), 3.20-3.22 (m, 4H), 3.80 (m, 1H), 4.70 (d, *J*=5.25, 1H), 4.76 (qui, *J*=6.83, 1H), 6.95 (d, *J*=8.76, 1H), 7.40 (s (br), 1H), 7.45 (s, 1H), 7.66 (d, *J*=8.76, 1H).

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-

diamine (7d)

Yield: 94%. m.p.: 133-135 °C. Elemental analysis: Calcd.for $C_{27}H_{38}N_8O$ (490.64): C, 66.09; H, 7.81; N, 22.84. Found: C, 66.04; H, 7.59; N, 22.61. HPLC-MS (ESI+): 491.65 (98.2%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.30 – 1.05 (m, 4H), 1.69 – 1.56 (m, 2H), 2.12 – 1.72 (m, 10H), 2.27-2.32 (m, 4H), 2.53 (t, *J* = 10.4, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.50-3.56 (m, 4H), 3.68 – 3.56 (m, 1H), 4.72 – 4.59 (sep, *J*=7.5, 1H), 6.39 (s(br), 1H), 7.15 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.0, 2H), 9.32 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.31, 31.76, 32.29, 35.57, 50.53, 53.65, 55.34, 62.67, 66.74, 114.51, 120.25, 129.42, 131.24, 137.12, 139.90, 152.50, 158.63.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -[4-(2-oxa-6-aza-spiro[3.3]hept-6-yl)-phenyl]-9Hpurine-2,6-diamine (7e)

Yield: 82%. m.p.: 146-147 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₇H₃₆N₈O (488.63): C, 66.37; H, 7.43; N, 22.93. Found: C, 66.11; H, 7.08; N, 22.69. HPLC-MS (ESI+): 489.7 (98.3%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.67-2.07 (m, 14H), 2.11-2.18 (m, 2H), 2.45-2.50 (m, 4H), 4.71-4.74 (m, 4H), 3.92-3.94 (m, 4H), 4.83 (qui, *J*= 5.4, 1H), 5.48 (d, *J*=5.44, 1H), 6.48 (d, *J*=8.50, 2H), 7.55 (d, *J*=8.50, 2H), 8.32 (s, 1H), 9.95 (s, 1H).

 N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)- N^6 -[4-(4-benzyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-9-cyclopentyl-9*H*-purine-2,6-diamine (7f)

Journal of Medicinal Chemistry

Yield: 92%. m.p.: 149-150 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₃₃H₄₃N₉ (565.77): C, 70.06; H, 7.66; N, 22.28. Found: C, 69.82; H, 7.48; N, 22.01. HPLC-MS (ESI+): 568.8 (99.9%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.28 – 1.12 (m, 8H), 1.70 – 1.58 (m, 4H), 2.11 – 1.74 (m, 19H), 2.65 – 2.57 (m, 2H), 3.02 (t, J = 9.8, 7H), 3.49 (d, J = 3.3, 9H), 3.62 – 3.54 (m, 4H), 4.69 – 4.59 (m, 2H), 6.29 (s(br), 1H), 6.82 (d, J = 8.8, 4H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 7.32 – 7.28 (m, 8H), 7.84 – 7.74 (m, 6H), 9.10 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 31.49, 32.29, 34.18, 49.62, 50.29, 53.16, 62.61, 116.25, 121.62, 127.51, 128.73, 128.73, 129.47, 133.19, 138.60, 146.85, 158.66.

N^2 -(4-Amino-butyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine (8a)

Yield: 85%. m.p.: 140-141 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₅H₃₆N₈O (464.61): C, 64.63; H, 7.81; N, 24.12. Found: C, 64.47; H, 7.43; N, 23.88. HPLC-MS (ESI+): 465.8 (96.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.38-1.66 (m, 6H), 1.87-1.92 (m, 6H), 2.07-2.09 (m, 4H), 2.53 (t, *J*=6.78,2H), 3.17 (q, *J*=6.39, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.39-3.55 (m, 4H), 4.69 (qui, *J*=7.11, 1H), 6.64 (t, *J*=5.34, 1H), 7.18 (d, *J*=8.28, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.95 (d, *J*=8.28, 2H), 9.34 (s (br), 1H).

N^2 -(5-Amino-pentyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine (8b)

Yield: 74%. m.p.: 118-120 °C. Elemental analysis: Calcd.for $C_{26}H_{38}N_8O$ (478.63): C, 65.24; H, 8.00; N, 23.14. Found: C, 65.56; H, 8.05; N, 22.92. HPLC-MS (ESI+): 479.90 (99.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.33-1.44 (m, 4H), 1.52-1.56 (m, 2H), 1.63-1.70 (m, 2H), 1.87-2.35 (m, 8H), 2.31-2.34 (m, 4H), 2.53 (t, *J*=6.42, 2H), 3.26 (q, *J*= 6.42, 2H), 3.40(s, 2H), 3.55-3.58 (m, 4H), 4.69 (qui, *J*=7.80, 1H), 6.60 (t, *J*=4.89, 1H), 7.18 (d, *J*=8.40, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.95 (d, *J*=8.40, 2H), 9.33 (s (br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.25, 24.62, 29.79, 32.30, 33.36, 42.04, 53.64, 55.37, 62.66, 66.75, 114.56, 120.27, 129.43, 131.26, 136.98, 139.88, 152.22, 152.52, 158.20, 159.35.

N^2 -(6-Amino-hexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine (8c)

Yield: 74%. m.p.: 135-136 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₇H₄₀N₈O (492.66): C, 65.82; H, 8.18; N, 22.74. Found: C, 65.96; H, 8.02; N, 22.64. HPLC-MS (ESI+): 493.93 (99.4%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.25-1.34 (m, 6H), 1.51-1.57 (m, 2H), 1.63-1.70 (m, 2H), 1.87-2.09 (m, 6H), 2.31-2.35 (m, 4H), 3.00 (s(br), 2H), 3.26 (q, *J*= 6.75, 2H), 3.39 (s, 2H), 3.53-3.59 (m, 4H), 4.69 (qui, *J*=6.96, 1H), 6.62 (t, *J*=6.18, 1H), 7.17 (d, *J*=8.25, 2H), 7.88 (s, 1H), 7.95 (d, *J*=8.25, 2H), 9.32 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.26, 26.87, 27.18, 29.94, 32.29, 33.48, 41.97, 53.64, 55.40, 62.67, 66.76, 114.57, 120.26, 129.41, 131.25, 136.98, 139.89, 152.22, 152.52, 159.36.

*N*²-Benzyl-9-cyclopentyl-*N*⁶-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine (8d)

Yield: 48 %. m.p.: 173-175 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₈H₃₃N₇O (483.61): C, 69.54; H, 6.88; N, 20.27. Found: C, 69.28; H, 7.07; N, 20.02. HPLC-MS (ESI+): 484.7 (96.5%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.71–1.58 (m, 2H), 1.87 – 1.77 (m, 4H), 2.02 – 1.91 (m, 2H), 2.19 – 2.06 (m, 2H), 3.09 – 2.96 (m, 2H), 3.14-3.18 (m, 2H), 3.81 – 3.71 (m, 2H), 3.90 (d, *J* =12.1, 2H), 4.10 (t, *J* = 5.6, 2H), 4.20 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.80(qui, *J*=7.0, 1H), 7.18-7.21 (m, 2H), 7.27–7.38 (m, 7H), 7.59–7.47 (m, 2H), 8.34 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 9.62 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.00, 31.82, 45.20, 50.31, 50.95, 59.06, 63.56120.14, 127.17, 127.24, 127.78, 128.75, 128.79, 129.14, 129.45, 130.67, 132.39, 132.61, 140.14, 140.60.

9-Cyclopentyl- N^2 -(4-methoxy-benzyl)- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9*H*-purine-2,6diamine (8e)

Yield: 64 %. m.p.: 228-230 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₉H₃₄N₆O₂ (513.63): C, 69.85; H, 6.87; N, 16.85. Found: C, 69.54; H, 6.59; N, 16.91. HPLC-MS (ESI+): 514.61 (95.5%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.68 – 1.58 (m, 2H), 1.86 – 1.78 (m, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 2H), 2.10 – 2.01 (m, 2H), 2.28-2.32 (s, 4H), 3.51-3.56 (m, 4H), 3.65 (s, 3H), 3.71 – 3.68 (m, 2H), 4.38 (d, *J* = 6.0 2H), 4.66 (qui, *J* = 7.5, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.5, 2H), 6.85 - 7.12 (m, 4H), 7.24 (d, *J* = 6.5, 3H), 7.82 (s, 2H), 7.86 (s, 1H), 9.30 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.19, 32.23, 44.64, 53.61, 55.51, 62.62, 66.74, 113.91, 114.09, 120.37, 128.91, 129.14, 129.45, 129.91, 131.31, 133.65, 137.18, 139.67, 152.50, 158.39, 159.11.

(9-Cyclopentyl-2-morpholin-4-yl-9*H*-purin-6-yl)-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-amine (8f) Yield: 96%. m.p.: 274-276 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₅H₃₃N₇O₂ (463.58): C, 64.77; H, 7.18; N, 21.15. Found: C, 64.69; H, 7.01; N, 21.42. HPLC-MS (ESI+): 465.69 (99.8%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.62-1.66 (m, 2H), 1.80-1.87 (m, 2H), 1.90-1.98 (m, 2H), 2.08-2.12 (m, 2H), 2.29-2.33 (m, 4H), , 3.36 (s, 2H), 3.52-3.55 (m, 4H), 3.62-3.65 (m, 1H), 4.71 (qui, *J*=7.5, 1H), 7.18 (d, *J*=8.00, 2H), 7.80 (d, *J*=8.00, 2H), 7.96 (s, 1H), 9.50 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.31, 32.36, 45.44, 53.69, 55.45, 62.66, 66.60, 66.74, 114.90, 120.42, 129.54, 131.72, 138.11, 139.41, 151.92, 152.16, 158.77

[9-Cyclopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-*9H*-purin-6-yl]-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)amine (8g)

Yield: 96%. m.p.: 248-250 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₅H₃₃N₇O₂ (476.62): C, 65.52; H, 7.61; N, 23.51. Found: C, 65.74; H, 7.92; N, 23.37. HPLC-MS (ESI+): 478.83 (99.7%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.10 (s, 3H), 1.62-1.69 (m, 2H), 1.83-1.90 (m, 2H), 1.90-1.96 (m, 2H), 2.08-2.114 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.28-2.32 (m, 4H), 2.34-2.38 (m, 4H), 3.36 (s, 2H), 3.50-3.55 (m, 4H), 3.65-3.69 (m, 4H), 4.70 (qui, *J*=7.50, 1H), 7.18 (d, *J*=8.50, 2H), 7.79 (d, *J*=8.50 2H), 7.95 (s, 1H), 9.47 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.29, 32.39, 44.73, 46.34, 53.68, 54.97, 55.35, 62.65, 66.73, 114.66, 120.44, 129.54, 131.64, 137.92, 139.47, 152.01, 152.13, 158.67.

(9-Cyclopentyl-2-piperidin-1-yl-9H-purin-6-yl)-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-amine (8h)

Yield: 96%. m.p.: 163-164 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₆H₃₅N₇O (461.60): C, 67.65; H, 7.64; N, 21.24. Found: C, 67.29; H, 7.38; N, 21.03. HPLC-MS (ESI+): 463.78 (99.7%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.20 (s, 1H), 1.71 – 1.59 (m, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 2H), 1.95 (td, *J* = 14.4, 7.0, 2H), 2.10 (td, *J* = 11.7, 6.7, 2H), 2.31 (s, 4H), 3.28 (s, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.53 (t, *J* = 4.4, 4H), 3.68 – 3.61 (m, 9H), 4.71 (p, *J* = 7.7, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.96 (s, 1H), 9.50 (s, 1H).¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.31, 32.36, 45.43, 53.69, 55.44, 62.65, 66.59, 66.73, 114.89, 120.49, 129.54, 131.72, 138.10, 139.40, 151.91, 152.15, 158.76.

2-[9-Cyclopentyl-6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenylamino)-*9H*-purin-2-ylamino]-ethanol (8i) Yield: 94 %. m.p.: 127-128 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₃H₃₁N₇O₂ (437.54): C, 63.14; H, 7.14; N, 22.41. Found: C, 63.28; H, 7.01; N, 22.30. HPLC-MS (ESI+): 439.60 (98.6%).¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.74 – 1.57 (m, 4H), 1.89 – 1.76 (m, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 2H), 2.14 – 2.01 (m, 2H), 2.30 (s, 4H), 3.32 – 3.25 (s, 2H), 3.49 – 3.43 (m, 2H), 3.53 (s, 4H), 4.47 (t, J = 4.4, 1H), 4.66 (qui, J=7.5, 1H), 6.54 (t, J = 5.1, 1H), 7.15 (d, J = 8.2, 2H), 7.86 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.2, 2H), 9.30 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.21, 32.34, 33.07, 39.14, 53.64, 55.34, 59.43, 62.65, 66.73, 114.52, 120.26, 129.51, 131.27, 136.96, 139.83, 152.13, 152.50, 159.40.

3-[9-Cyclopentyl-6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenylamino)-9*H*-purin-2-ylamino]-propan-1-ol (8j)

Yield: 96 %. m.p.: 136-139 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₄H₃₃N₇O₂ (451.56): C, 63.84; H, 7.37; N, 21.71. Found: C, 63.49; H, 7.54; N, 21.42. HPLC-MS (ESI+): 452.63 (97.8%).¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.70 – 1.59 (m, 3H), 1.88 – 1.80 (m, 3H), 1.99 – 1.89 (m, 3H), 2.14 – 2.03 (m, 3H), 2.30 (s, 6H), 4.70 – 4.61 (m, 3H), 6.42 (t, *J* = 5.2, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.1, 3H), 7.87 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5, 3H), 9.31 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.22, 32.33, 44.63, 53.65, 55.36, 60.63, 62.66, 66.73, 120.29, 129.52, 131.29, 137.07, 139.78, 152.52, 159.33.

4-[9-Cyclopentyl-6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenylamino)-*9H*-purin-2-ylamino]-butan-1-ol (8k) Yield: 88 %. m.p.: 119-121 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₅H₃₅N₇O₂ (451.56): C, 64.49; H, 7.58; N, 21.06. Found: C, 64.49; H, 7.62; N, 20.85. HPLC-MS (ESI+): 466.49 (98.4%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.45 (qui, J = 6.5, 2H), 1.53 (qui, J = 6.5, 2H), 1.69 – 1.60 (m, 2H), 1.89 – 1.77 (m, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 2.28-2.32 (m, 4H), 3.24 (q, J = 6.5, 2H), 3.48 (s, 2H), 3.51-3.57(m, 4H), 4.38 (t, J = 5.0, 1H), 4.66 (qui, J=7.0, 1H), 6.58 (t, J = 5.4, 1H), 7.15 (d, J = 8.3, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.3, 2H), 9.29 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.25, 26.52, 30.76, 32.30, 41.77, 53.63, 55.36, 61.25, 62.72, 66.73, 112.78, 114.55, 120.24, 129.49, 131.26, 137.00, 139.92, 152.48, 159.37.

N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(6-morpholin-4-yl-pyridin-3-yl)-9*H*-purine-2,6diamine (8l)

Yield: 94%. m.p.: 283-284 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₅H₃₅N₉O (477.61): C, 62.87; H, 7.39; N, 26.39. Found: C, 62.61; H, 7.11; N, 26.02. HPLC-MS (ESI+): 478.57 (98.2%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.29-1.49 (m, 4H), 1.77-1.79 (m, 2H), 1.97-2.04 (m, 4H), 2.21-2.26 (m, 6H), 2.86 (sep, *J*= 5.26, 1H), 3.14-3.18 (m, 4H), 3.83 (sex, *J*=4.02, 1H), 3.88-3.91 (m, 4H), 4.73 (qui, *J*= 5.74, 1H), 4.86 (d, *J*= 4.02, 1H), 6.91 (s, 1h), 7.46-7.49 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 8.26 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 30.98, 31.92, 32.27, 46.39, 49.84, 66.53, 107.07, 129.22, 131.27, 137.14, 140.49, 152.67, 155.60, 158.56.

9-Cyclopentyl-2-morpholin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-morpholin-4-yl-pyridin-3-yl)-amine (8m)

Yield: 87%. m.p.: 220-222 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₃H₃₀N₈O (450.54): C, 61.31; H, 6.71; N, 24.87. Found: C, 61.54; H, 6.48; N, 24.26. HPLC-MS (ESI+): 451.57 (97.6%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.61-1.67 (m, 2H), 1.83-1.83 (m, 2H), 1.91-1.96 (m, 2H), 2.07-2.09 (m, 2H), 3.38-3.40 (m, 4H), 3.61-3.68 (m, 12H), 4.70 (qui, J= 5.26, 1H), 6.80 (d, J=9.0, 1H), 7.91-7.97 (m, 2H), 8.52 (s, 1H), 9.41 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.23, 32.35, 45.34, 46.28, 55.56, 66.52, 107.19, 114.70, 128.54, 130.08, 131.77, 138.03, 140.68, 151.74, 152.29, 155.81, 158.84.

N^2 -(4-Amino-butyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-yl-phenyl)-9*H*-purine-2,6-diamine (8n)

Yield: 88%. m.p.: 237-239 °C. Elemental analysis: Calcd.for $C_{24}H_{34}N_8O$ (450.58): C, 63.97; H, 7.61; N, 24.87. Found: C, 64.11; H, 7.38; N, 24.59. HPLC-MS (ESI+): 451.8 (100.0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ ppm 1.39-1.45 (m, 2H), 1.54-1.59 (m, 2H), 1.65-1.69 (m, 2H), 1.87-2.10 (m, 6H), 2.58 (t, *J*=6.60, 2H), 2.97 (s(br), 2H), 3.02-3.05 (m, 4H), 3.27 (q, *J*=6.36, 2H), 3.72-3.75 (m, 4H), 4.68 (qui, *J*=7.26, 1H), 6.86 (d, *J*=8.94, 2H), 7.81 (d, *J*= 8.94, 2H), 7.85 (s, 1H), 9.14 (s(br), 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 24.24, 27.35, 30.89, 32.32, 41.86, 49.77, 55.34, 66.71, 114.40, 115.87, 121.70, 133.41, 136.65, 146.80, 151.99, 152.59, 157.99, 159.40.

 N^2 -(4-amino-butyl)-9-cyclopentyl- N^6 -[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenyl]-9*H*-purine-2,6-diamine (80)

Yield: 92%. m.p.: 163-165 °C. Elemental analysis: Calcd.for C₂₆H₃₉N₉ (477.65): C, 65.38; H, 8.23; N, 26.39. Found: C, 65.29; H, 7.89; N, 26.39. HPLC-MS (ESI+): 478.91 (96.7%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.02 (t, *J*=7.11, 3H), 1.38-1.42 (m, 2H), 1.51-1.57 (m, 2H), 1.63-1.68 (m, 2H), 1.85-2.09 (m, 6H), 2.35 (q, *J*=7.11, 2H), 2.55 (t, *J*=7.26, 2H), 2.98 (s(br), 2H), 3.03-3.06 (m, 4H), 3.22-3.29 (m, 6H), 4.67 (qui, *J*=7.62, 1H), 6.52 (t, *J*=5.94, 1H), 6.85 (d, *J*=8.70, 2H), 7.80 (d, *J*=8.70, 2H), 7.85 (s, 1H), 9.11 (s(br), 1H). ¹³C NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11.94, 23.62, 26.74, 31.69, 40.05, 46.28, 48.88, 51.56, 52.36, 54.28, 112.18, 115.43, 121.10, 132.43, 136.20, 146.23, 151.97, 158.81.

Kinase assays

FLT3 WT, FLT3 ITD and FLT3 D835 were purchased from ProQinase. The kinase reactions were assayed with peptide substrate (1 mg/mL AGLT (poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) 6:2:5:1 hydrobromide) in the presence of 1 μ M ATP, 0.05 μ Ci [γ -³³P]ATP, and the test compound in a final volume of 10 μ L, all in a reaction buffer (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-orthovanadate, 1.2 mM DTT, 2.5 μ g / 50 μ l PEG_{20.000}). The reactions were stopped by adding 5 μ L of 3% aq. H₃PO₄. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), washed 3× with 0.5% aq. H₃PO₄ and finally air-dried. Kinase inhibition was quantified using a FLA-7000 digital image analyzer. The concentration of the test compounds required to reduce the kinase's activity by 50 % was determined from dose-response curves and reported as the IC₅₀ value.

Kinase Selectivity Profiling

Preliminary protein kinase selectivity of compound **7d** was evaluated at a single concentration (10 nM) by screening against 309 enzymes at Carna Biosciences.

Cell Culture

Human cell lines were obtained from the American Type Culture Collection or the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures and were cultivated according to the provider's instructions. Briefly, MV4-11, MOLM-13, THP-1, U937 were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). Kasumi-1 and HCC-827 were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). K562, MCF-7 and BJ cell lines were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 μ g/ml). MRC-5 cells were cultivated in EMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% NEAA, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) were isolated and cultivated as described previously.²³ All cell lines were cultivated at 37 °C in 5% CO₂.

Cell Viability Assays

For the cytotoxicity assays, cells were treated in triplicate with six different doses of each compound for 72 h. After treatments, Calcein AM solution was added for 1 hour, and fluorescence from live cells was measured at 485 nm/538 nm (excitation/emission) using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems). The GI₅₀ value, the drug concentration lethal to 50% of the cells, was calculated from the dose response curves that resulted from the assays.

Flow Cytometry

Asynchronous cells were seeded and, after a preincubation period, treated with tested compounds for 24 hours. After the staining with propidium iodide, DNA content was analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (BD FACS Verse with software BD FACSuiteTM, version 1.0.6.). Cell cycle distribution was analyzed using ModFit LT (Verity Software House).

Immunoblotting

Cell lysates were prepared, then proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After blocking, overnight incubation with specific primary antibodies, and incubation with peroxidase-conjugated secondary antibodies, peroxidase activity was detected with SuperSignal West Pico reagents (Thermo Scientific) using a CCD camera LAS-4000 (Fujifilm). The following specific antibodies were purchased from Cell signaling: anti-FLT3 (8F2) and anti-phospho-FLT3 Y589/591 (30D4), anti-phospho-FLT3 Y591 (33G6), anti-phospho-FLT3 Y842 (10A8), anti-STAT5, anti-phospho-STAT5 Y694, anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2 T202/Y204, anti-MEK1/2 (D1A5), anti-phospho-MEK1/2 S217/221 (41G9). Anti-GAPDH was purchased from Sigma Aldrich, and anti-PCNA (clone PC-10) was generously gifted by Dr. B. Vojtěšek.

Caspase-3/7 assay

Cellular caspase-3/7 activity was measured according to a previously published procedure.²⁴ MV4-11 and K562 cells were cultivated in a 96-well plate overnight. On the next day, the cells were treated with increasing concentrations of compound **7d** for 24 h. After incubation, 3x caspase-3/7 assay buffer (150 mM HEPES pH 7.4, 450 mM NaCl, 150 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1.2 mM EGTA, 1.5% Nonidet P40, 0.3% CHAPS, 30% sucrose, 30 mM DTT, 3 mM PMSF) containing 150 µM peptide substrate Ac-DEVD-AMC (Enzo Life Sciences) was added and after 2h incubation, the caspase-3/7 activity was measured using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems) at 346 nm/442 nm (excitation/emission).

In Vivo Efficacy

Female athymic nu/nu mice (ENVIGO) were subcutaneously implanted with MV 4-11 (5×10^6 cells in log-phase) in a mixture with Matrigel (Corning) on day 0. Body weights and tumor growth were assessed 3 times per week. The latter was measured by caliperation (using vernier caliper), and tumor volumes were calculated using the formula: tumor volume [mm³] = width² × (length/2) [mm; mm]. The treatment began when the tumors reached a mean volume of about 640 mm³ (approx. 14 days
Journal of Medicinal Chemistry

after inoculation). Quizartinib and **7d** were formulated in saline or acidified saline (pH 6.8 for application) and were administered as single doses of 10 mg/kg by intraperitoneal (i.p.) injection. Control animals received saline only. The tumors were harvested at various post-treatment intervals; after harvesting, they were mechanically disintegrated and lysed in ice cold lysis buffer. Proteins from the lysates (50 μ g of total protein) were separated by SDS/PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblotted with specific primary antibodies at 4 °C overnight. The HRP-conjugated secondary antibodies used for detection were incubated with membrane for 1 hour at RT and immunoblots were scanned using a Li-COR system (Li-COR Biosciences).

Homology Modeling and Molecular Docking

The X-ray crystal structure of FLT3 available from PDB (1RJB) is in an inactive conformation. We have therefore built the active DFG-in conformation of FLT3 by homology modeling based on the c-KIT kinase template (PDB ID: 1PKG). The dimer of active c-KIT contains two identical chains, chain A was selected. With default setting of Prime in Schrodinger 2017 we built the homology model and subjected it to energy minimization using the OPLS3 all-atom force field.²⁵ The docking was carried out with Glide using the homology model structure (Schrodinger Suite; Small-Molecule Drug Discovery Suite 2016-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016). FLT3 model was checked for steric clashes as well as for correct protonation states and hydrogen bonding patterns.²⁶ No explicit water molecules were present. The protein grid was created using default settings. All ligands were converted from 2D to 3D using Ligprep module (Schrodinger Suite). Docking was performed with Glide (version, 75103) in standard precision (SP) mode with flexible ligand docking and verified by induced fit docking (IFD) (Schrodinger Suite 2017; Schrodinger LLC, New York, NY). The first stage of IFD protocol performed an initial softened-potential docking of the ligand to rigid receptor, with van der Waals radii scaling of 0.50 for both FLT3 kinase homology model and ligands. Sampling of the protein for each of top 20 ligand poses was performed using Prime. Residues within 5Å of any ligand were refined; this consisted of the side chain conformational search and optimization, followed by full minimization of the residues and ligand. Complexes within 30.0 kcal/mol of minimum energy

structure were taken forward for redocking. The related ligand was redocked into each low energy, induced-fit structure with default Glide settings.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI:

10.1021/acs.jmedchem ...

Preparation of some precursors, preliminary kinase selectivity profile of **7d**, control experiments with quizartinib (FLT3 and its downstream signaling pathway inhibition, cell cycle in the MV4-11 cell line), quantification of phosphorylation levels in tumor tissue harvested from xenografts, NMR spectra of prepared compounds.

Molecular formula strings (CSV).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vladimir.krystof@upol.cz. Phone: +420585634854.

OCRID

Vladimír Kryštof: 0000-0001-5838-2118

Karel Berka: 0000-0001-9472-2589

Author Contributions

T.G. and V.M. prepared compounds, E.Ř. and R.J. performed biochemical and cellular experiments,

T.R.M. and Z.K. performed animal experiments, V.B., K.B., H.A., M.L. performed computational

experiments, V.D and V.K. designed the study and drafted the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the institutional support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (National Program of Sustainability I, LO1204), the Ministry of Health

ACS Paragon Plus Environment

Journal of Medicinal Chemistry

of the Czech Republic (15-28951A), and Palacky University in Olomouc (IGA_PrF_2017_014). HUVECs were kindly provided by prof. Ulrichová. This work has been supported by the Large Infrastructures for Research, Experimental Development and Innovations project "IT4Innovations National Supercomputing Center "LM2015070". HA and ML thank the research project RVO 61388963, awarded by the Czech Academy of Sciences and the Czech Science Foundation (grant number P208/12/G016).

References

- 1. Rahman, N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*. 2014, 505, 302-308.
- Gilliland, D.; Griffin, J. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002, 100, 1532-1542.
- Carow, C.; Kim, E.; Hawkins, A.; Webb, H.; Griffin, C.; Jabs, E; Civin, C. I.; Small, D. Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13Q12-->Q13. *Cytogenet*. *Cell Genet.* 1995, 70, 255-257.
- Nakao, M.; Yokota, S.; Iwai, T.; Kaneko, H.; Horiike, S.; Kashima, K.; Sonoda, Y.; Fujimoto, T.; Misawa, S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996, 10, 1911-1918.
- Stirewalt, D. L.; Kopecky, K. J.; Meshinchi, S.; Engel, J. H.; Pogosova-Agadjanyan, E. L.; Linsley, J.; Slovak, M. L.; Willman, C. L.; Radich, J. P. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006, *107*, 3724-3726.
- Pemmaraju, N.; Kantarjian, H.; Ravandi, F.; Cortes, J. FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era? *Cancer*. 2011, *117*, 3293-304.
- Wander, S. A.; Levis, M. J.; Fathi, A. T. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther. Adv. Hematol.* 2014, *5*, 65-77.
- Pemmaraju, N.; Kantarjian, H.; Andreeff, M.; Cortes, J.; Ravandi, F. Investigational FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2014, 23, 943-954.

- Zimmerman, E. I.; Turner, D. C.; Buaboonnam, J.; Hu, S.; Orwick, S.; Roberts, M.S.; Janke, L. J.; Ramachandran, A.; Stewart, C. F.; Inaba, H.; Baker, S. D. Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013, *122*, 3607-3615.
- Lee, L.Y.; Hernandez, D.; Rajkhowa, T.; Smith, S.C.; Raman, J. R.; Nguyen, B.; Small, D.; Levis, M. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood.* 2017, *129*, 257-260.
- Poulsen, A.; William, A.; Blanchard, S.; Lee, A.; Nagaraj, H.; Wang, H.; Teo, E.; Tan, E.; Goh, K. C.; Dymock, B. Structure-based design of oxygen-linked macrocyclic kinase inhibitors: discovery of SB1518 and SB1578, potent inhibitors of Janus kinase 2 (JAK2) and Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3). *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2012, *26*, 437-450.
- Goh, K. C.; Novotny-Diermayr, V.; Hart, S.; Ong, L. C.; Loh, Y. K.; Cheong, A.; Tan, Y. C.; Hu, C.; Jayaraman, R.; William, A. D.; Sun, E. T.; Dymock, B. W.; Ong, K. H.; Ethirajulu, K.; Burrows, F.; Wood, J. M. TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia*. 2012, *26*, 236-243.
- Keegan, K.; Li, C.; Li, Z.; Ma, J.; Ragains, M.; Coberly, S.; Hollenback, D.; Eksterowicz, J.; Liang, L.; Weidner, M.; Huard, J.; Wang, X.; Alba, G.; Orf, J.; Lo, M. C.; Zhao, S.; Ngo, R.; Chen, A.; Liu, L.; Carlson, T.; Quéva, C.; McGee, L. R.; Medina, J.; Kamb, A.; Wickramasinghe, D.; Dai, K. Preclinical evaluation of AMG 925, a FLT3/CDK4 dual kinase inhibitor for treating acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 2014, *13*, 880-889.
- Li, Z.; Wang, X.; Eksterowicz, J.; Gribble, M. W. Jr.; Alba, G. Q.; Ayres, M.; Carlson, T. J.; Chen, A.; Chen, X.; Cho, R.; Connors, R. V.; DeGraffenreid, M.; Deignan, J. T.; Duquette, J.; Fan, P.; Fisher, B.; Fu, J.; Huard, J. N.; Kaizerman, J.; Keegan, K. S.; Li, C.; Li, K.; Li, Y.; Liang, L.; Liu, W.; Lively, S. E.; Lo, M. C.; Ma, J.; McMinn, D. L.; Mihalic, J. T.; Modi, K.; Ngo, R.; Pattabiraman, K.; Piper, D. E.; Queva, C.; Ragains, M. L.; Suchomel, J.; Thibault, S.; Walker, N.; Wang, X.; Wang, Z.; Wanska, M.; Wehn, P. M.; Weidner, M. F.; Zhang, A. J.; Zhao, X.; Kamb, A.; Wickramasinghe, D.; Dai, K.; McGee, L. R.; Medina, J. C. Discovery of AMG 925, a FLT3 and CDK4 dual kinase inhibitor with preferential affinity for the activated state of FLT3. *J. Med. Chem.* 2014, *57*, 3430-3449.

Journal of Medicinal Chemistry

- Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Řezníčková, E.; Béres, T.; Strnad, M.; Kryštof, V. A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2013, *56*, 6234-6247.
- Zatloukal, M.; Jorda, R.; Gucky, T.; Reznickova, E.; Voller, J.; Pospisil, T.; Malinkova, V.; Adamcova, H.; Krystof, V.; Strnad, M. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, *61*, 61-72.
- Lu, W.; Sengupta, S.; Petersen, J. L.; Akhmedov, N. G.; Shi, X. Mitsunobu coupling of nucleobases and alcohols: an efficient, practical synthesis for novel nonsugar carbon nucleosides. *J. Org. Chem.* 2007, 72, 5012-5015.
- Davies, N. G.; Browne, H.; Davis, B.; Drysdale, M. J.; Foloppe, N.; Geoffrey, S.; Gibbons, B.; Hart, T.; Hubbard, R.; Jensen, M. R.; Mansell, H.; Massey, A.; Matassova, N.; Moore, J. D.; Murray, J.; Pratt, R.; Ray, S.; Robertson, A.; Roughley, S. D.; Schoepfer, J.; Scriven, K.; Simmonite, H.; Stokes, S.; Surgenor, A.; Webb, P.; Wood, M.; Wright, L.; Brough, P. Targeting conserved water molecules: design of 4-aryl-5-cyanopyrrolo[2,3-d]pyrimidine Hsp90 inhibitors using fragment-based screening and structure-based optimization. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, *20*, 6770-6789.
- Zarrinkar, P. P.; Gunawardane, R. N.; Cramer, M. D.; Gardner, M. F.; Brigham, D.; Belli, B.; Karaman, M. W.; Pratz, K. W.; Pallares, G.; Chao, Q.; Sprankle, K. G.; Patel, H. K.; Levis, M.; Armstrong, R. C.; James, J. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2009, *114*, 2984-2992.
- Gunawardane, R. N.; Nepomuceno, R. R.; Rooks, A. M.; Hunt, J. P.; Ricono, J. M.; Belli, B.; Armstrong, R. C. Transient exposure to quizartinib mediates sustained inhibition of FLT3 signaling while specifically inducing apoptosis in FLT3-activated leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* 2013, *12*, 438-47.
- Kampa-Schittenhelm, K. M.; Heinrich, M. C.; Akmut, F.; Döhner, H.; Döhner, K.; Schittenhelm,
 M. M. Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that

displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms. *Mol. Cancer.* 2013, *12*, 19.

- Bruner, J. K.; Li, L.; Ma, H. S.; Qin, A. C. R.; Levis, M. J.; Pratz, K. W.; Pratilas, C. A.; Small, D. Signaling adaptation to TKI treatment reactivates ERK signaling in FLT3/ITD leukemia. *Blood*. 2016, *128*, 33.
- McGregor, P. E.; Agrawal, D. K.; Edwards, J. D. Technique for assessment of leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 1994, 32, 73-77.
- Carrasco, R. A.; Stamm, N. B.; Patel, B. K. One-step cellular caspase-3/7 assay. *Biotechniques*.
 2003, 34, 1064-7.
- 25. Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyan, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D. S.; Krilov, G.; Jorgensen, W. L.; Abel, R.; Friesner, R. A. OPLS3: A force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12*, 281-296.
- Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1750-1759.

1



biochemical cellular NH FLT3-ITD IC₅₀ = 3 nM comp. 7d FLT3 D835 IC₅₀ = 8 nM NH₂



acute leukemia MV4-11 IC₅₀ = 2 nM



inhibition of FLT3-ITD in a MV4-11 xenograft

SUPPORTING INFORMATION

Discovery of N^2 -(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl- N^6 -(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia

Tomáš Gucký^a, Eva Řezníčková^b, Tereza Radošová Muchová^c, Radek Jorda^b, Zuzana Klejová^c, Veronika Malínková^a, Karel Berka^d, Václav Bazgier^d, Haresh Ajani, ^{d,e} Martin Lepšík^e, Vladimír Divoký^c, Vladimír Kryštof^{b*}

^a Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^bLaboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

^c Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

^d Department of Physical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^e Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

*Corresponding Author. Vladimír Kryštof, Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic. Phone: +420585634854, Fax: +420585634870. E-mail: vladimir.krystof@upol.cz

Content:

Scheme S1. Preparation of 6-morpholin-4-ylpyridin-3-amine (4a) and 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)aniline (4b) substituents.

Table S1. Preliminary kinase selectivity profile of 7d.

Figure S1. Effect of quizartinib on FLT3 and some of its downstream signaling pathways.

Figure S2. Effect of quizartinib on cell cycle in the MV4-11 cell line.

Figure S3. Quantification of inhibition in ERK1/2, STAT5 and FLT3-ITD phosphorylation levels in tumor tissue harvested from MV4-11 xenografts treated with **7d** or quizartinib.

NMR spectra of prepared compounds.

Scheme S1. Reaction conditions: a) K₂CO₃, ethanol, secondary amine, reflux; b) H₂/Pd-C 5%, rt, atmospheric pressure.



2a: X = Br, Q = CH 2b: X = F, Q =N 3b, 4b: Q = CH, R¹ = 2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl **Table S1.** Preliminary kinase selectivity profile of 7d.

Kinases	Inhibition of kinase activity 7d (10 nM)
FLT3, PDGFRβ, PDGFRα, CLK1, TRKA, TRKC, QIK, TRKB, CaMK2δ, SIK, YES, FMS, CAMK2γ, KIT (D816V), MNK2, ACK, SRC, PDGFRα(V561D)	100 - 90 %
DDR1, DDR2, LCK, PDGFRa(D842V), PHKG1, MER, MNK1, ITK, CaMK2a, MUSK, SLK, FLT4, LYNb, FYN (isoform b), CLK2, LOK, LYNa, ALK (L1196M), FGR, FYN (isoform a), FLT1, CDK2/CycA2, DYRK1B, MAP4K2, HCK, MARK4, KDR, CDK5/p25, FRK, ALK (F1174L), KIT, MST1	89 - 60 %
CDK9/CycT1, CDK2/CycE1, EPHB1, MARK3, AXL, SRPK2, ALK, IRR, MARK1, ABL, ARG, CDK7/CycH/MAT1, CAMK2β, NPM1-ALK, NuaK1, FGFR2, CDK4/CycD3, BLK, KIT (D816E), DYRK1A, PAK5, FGFR1, JAK3, HER4, MARK2, TSSK1, AMPKα2/β1/γ1, PHKG2, EML4-ALK, TEC, ALK (R1275Q), RET (S891A), IRAK4, FGFR1 (V561M)	59 - 40 %
IRAK1, EPHA1, TXK, PKN1, HGK, FGFR3, ABL (E255K), FES, LTK, TNK1, EGFR (d746-750), KIT (V560G), MLK3, EPHB4, CRIK, FER, CK1δ, NuaK2, PDGFRα(T674I), PIK3CA/PIK3R1, SYK, MLK1, TYRO3, MAP3K3, HIPK4, FGFR3 (K650E), EGFR (L858R), TNIK, PAK4, CHK1, CK1α, YES (T348I), FGFR3 (K650M), PKD2, INSR, CDC2/CycB1, PKD3, PKCζ, KIT(V654A), AMPKα1/ β 1/ γ 1, PKC1, RET, CDK3/CycE1, PYK2, EPHA8, ABL (T315I), EPHB2, AurB, BTK, BMX, RET (M918T), NDR2, PKD1, RET (G691S), SRPK1, ROS, NDR1, FAK, JAK2, MELK, EGFR (L861Q), DCAMKL2, MST3, CLK3, RSK4, RSK3, EGFR, RSK2, MST4, IGF1R, MST2, EPHA4, CK1ε, Haspin, P70S6K, PAK6, LATS2, EPHA2, RET (Y791F), MOS, JNK1, PKCδ, IKKα, BRAF, PKCε, RSK1, CSK, CDK6/CycD3, PRKX, MINK, PKR, COT, ROCK1, FGFR4 (V550L), EPHA5, HIPK2, PKACβ, PKCθ, TBK1, NEK2, PKACα, skMLCK, CaMK1δ, FGFR4(V550E), MET(Y1235D), HIPK3, ROCK2, RON, EPHB3, BRK, MAP3K5, AurA/TPX2, MAP3K2, PLK2, BRSK1, JAK1, AurC, MAP2K6, FGFR4, MLK2, KIT (T670I), TYK2, PIM1, MRCKβ, AKT2, CK1 γ 1, KIPK1, PEK, DYRK2, CGK2, MET, SPHK2, MAP2K7, CaMK1α, NEK9, CHK2,	< 40 %

MAP3K4, IKKE, EPHA3, DLK, TAOK2, MET (M1250T), SGK, PLK3, MAPKAPK5, DYRK3, MAP2K4, MGC42105, PKCa, NEK1, PAK1, PGK, AurA, EPHA7, Erk2, PKCβ2, SRM, MSSK1, JNK2, PKCγ, CK1γ3, SGK3, CaMK4, CK1y2, PBK, TIE2, Erk5, DAPK1, MRCKa, PKACy, MAP3K1, p70S6Kβ, PKCŋ, MET(D1228H), GSK3β, BRSK2, JNK3, EGFR(T790M/L858R), TSSK2, p38β, p38γ, WNK1, PKCβ1, TSSK3, PLK1, WNK2, RAF1, NEK6, NEK4, p38a, MSK1, CDC7/ASK, MSK2, PIM2, WNK3, EGFR(T790M), BRAF(V600E), MAP2K5, MAP2K1, PDHK2, EEF2K, TAK1-TAB1, MAPKAPK2, SPHK1, EPHA6, PIM3, p38δ, CK2α2/β, EGFR(d746-750/T790M), GSK3α, NEK7, PDK1, HER2, AKT3, IKKβ, MAPKAPK3, CK2α1/β, PDHK4, MAP2K2, PASK, MAP2K3, SGK2, AKT1, PAK2, Erk1

Figure S1. Effect of quizartinib on FLT3 and some of its downstream signaling pathways.



Figure S2. Effect of quizartinib on cell cycle in the MV4-11 cell line.



Figure S3. Quantification of inhibition in ERK1/2, STAT5 and FLT3-ITD phosphorylation levels in tumor tissue harvested from MV4-11 xenografts treated with **7d** (A) or quizartinib (B), related to Figure 4. In each lysate from Figure 4, both the total and phospho-levels of indicated signaling molecules were quantified by ImageJ Software. As the first step, both signal intensities of total and phosphoprotein bands were normalized to GAPDH signal. Then, the ratio of phosphoprotein to total protein was plotted as percentage value referenced to untreated control animals (mean \pm SD).



¹H NMR spectrum of compound **5a**



¹³C NMR spectrum of compound **5a**



¹H NMR spectrum of compound **5b**



¹H NMR spectrum of compound **5**c



¹H NMR spectrum of compound **5d**



¹H NMR spectrum of compound **5e**



¹³C NMR spectrum of compound **5e**



¹H NMR spectrum of compound **5**f



¹³C NMR spectrum of compound **5**f



¹H NMR spectrum of compound 5g



¹³C NMR spectrum of compound **5**g



¹H NMR spectrum of compound **5h**



¹³C NMR spectrum of compound **5h**



¹H NMR spectrum of compound **5**i



¹³C NMR spectrum of compound **5**i



¹H NMR spectrum of compound **5**j



¹³C NMR spectrum of compound **5**j



¹H NMR spectrum of compound **5**k



¹H NMR spectrum of compound **5**l



¹³C NMR spectrum of compound **5**l



¹H NMR spectrum of compound **5m**



¹H NMR spectrum of compound **6a**



¹³C NMR spectrum of compound **6a**


¹H NMR spectrum of compound **6b**



¹³C NMR spectrum of compound **6b**



¹H NMR spectrum of compound **6c**



0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.1 0.11 0.12 0.13 0 abundance -0.06 -0.05 -0.04 -0.03 -0.02 -0.01 150.0 120.0 50.0 40.0 30.0 140.0 130.0 110.0 100.0 90.0 80.0 70.0 60.0 35.674 ----32.278 ----31.772 -----50.630 -49.123 -24.476 > 24.180 > - X 158.518 - X 1 123.798 ⁻ 122.224 ⁻ 113.525 -131.419

¹³C NMR spectrum of compound **6**c

¹H NMR spectrum of compound **6d**



¹³C NMR spectrum of compound **6d**



¹H NMR spectrum of compound **6e**



¹³C NMR spectrum of compound **6e**







¹³C NMR spectrum of compound **6f**

¹H NMR spectrum of compound **6g**



¹³C NMR spectrum of compound **6g**



¹H NMR spectrum of compound **6h**



¹H NMR spectrum of compound **6i**



¹³C NMR spectrum of compound **6i**



¹H NMR spectrum of compound **6**j



¹³C NMR spectrum of compound **6j**



¹H NMR spectrum of compound **6**k



¹³C NMR spectrum of compound **6k**



¹H NMR spectrum of compound **6**



¹³C NMR spectrum of compound **6**l



¹H NMR spectrum of compound **6m**



¹³C NMR spectrum of compound **6m**



¹H NMR spectrum of compound **6n**



¹³C NMR spectrum of compound **6n**



¹H NMR spectrum of compound **60**



¹³C NMR spectrum of compound **60**



¹H NMR spectrum of compound **7a**



¹³C NMR spectrum of compound **7a**



¹H NMR spectrum of compound **7b**



¹³C NMR spectrum of compound **7b**



¹H NMR spectrum of compound **7**c



¹³C NMR spectrum of compound **7**c



¹H NMR spectrum of compound **7d**



¹³C NMR spectrum of compound **7d**



¹H NMR spectrum of compound **7e**


¹³C NMR spectrum of compound **7e**



¹H NMR spectrum of compound **7f**



¹³C NMR spectrum of compound **7f**



¹H NMR spectrum of compound 8a



¹³C NMR spectrum of compound 8a



¹H NMR spectrum of compound **8b**



¹³C NMR spectrum of compound **8b**



¹H NMR spectrum of compound 8c



¹³C NMR spectrum of compound **8c**



¹H NMR spectrum of compound **8d**



¹³C NMR spectrum of compound **8d**



¹H NMR spectrum of compound **8e**



¹³C NMR spectrum of compound **8e**



¹H NMR spectrum of compound **8f**



¹³C NMR spectrum of compound **8f**







¹³C NMR spectrum of compound **8g**



¹H NMR spectrum of compound **8g**



¹³C NMR spectrum of compound **8g**



¹H NMR spectrum of compound **8i**



¹³C NMR spectrum of compound 8i



¹H NMR spectrum of compound **8**j



¹³C NMR spectrum of compound **8**j



¹H NMR spectrum of compound **8k**



¹³C NMR spectrum of compound **8k**



¹H NMR spectrum of compound **8**I



¹³C NMR spectrum of compound 81



¹H NMR spectrum of compound **8m**



¹³C NMR spectrum of compound **8m**



¹H NMR spectrum of compound **8n**



¹³C NMR spectrum of compound **8n**



¹H NMR spectrum of compound **80**



¹³C NMR spectrum of compound **80**



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Autoreferát k disertační práci

Syntéza a biologická aktivita nových inhibitorů kinas

Mgr. Veronika Malínková Olomouc 2017 Tato disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu oboru biochemie P1406 Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2013 - 2017. Školícím pracovištěm byla Laboratoř růstových regulátorů, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

Uchazeč: Mgr. Veronika Malínková

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum,

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

Školitel: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum,

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

Konzultant: RNDR. Tomáš Gucký, Ph.D:

Laboratoř růstových regulátorů Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

 Oponenti: doc. Mgr. Kamil Paruch, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity Brno - Ústav chemie Kamenice 753/5, 625 00 Brno
doc. RNDr. Petr Mlejnek, Ph.D.
Lékařská fakulta Univerzity Palackého – Ústav normální anatomie Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc Stanovisko k disertační práci vypracovala Katedra biochemie PřF UP v Olomouci.

Autoreferát byl rozeslán dne Obhajoba se koná dne před komisí pro obhajoby disertačních prací v oboru biochemie v místnosti.....budovy A, Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci-Holici, Šlechtitelů 27. S disertací je možno se seznámit v knihovně biologických kateder Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci-Holici.

Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních

prací v oboru biochemie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Abstrakt:

Po objevu imatinibu se kinasy staly jednou nejintenzivněji studovanou skupinou cílů pro léčiva. Od té doby byly připraveny látky, které inhibují více než 30 druhů různých kinas, kdy převážná část z nich souvisí s rakovinou, ale i imunologickými, neurologickými, metabolickými a infekčními onemocněními. Mezi významné farmakofory patří purinové jádro a mnoho purinových derivátů se dokonce dostalo do preklinického nebo klinického testování. Tato disertační práce byla zaměřena nejprve na přípravu nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů a jejich charakterizaci. Látky byly navrženy tak, aby vykazovaly potenciální aktivitu vůči PDGFR α a FLT3. Tyto kinasy patří mezi tyrosinové kinasy často onkogenně aktivované u různých nádorových onemocnění. Bylo zjištěno, že důležitým strukturním motivem pro jejich inhibici je přítomnost 6-fenylaminopyrimidinového motivu. Součástí práce byla i charakterizace biologických účinků připravených látek na vybraných nádorových liniích, kde byla zjištěna antiproliferační aktivita a její souvislost s inhibicí kinas PDGFR α a FLT3.

Abstract:

Following the discovery of imatinib, kinases have become one of the most intensively studied target groups for pharmaceuticals. Since then, substances have been prepared that inhibit more than 30 kinds of various kinases, most of which are related to cancer but also immunological, neurological, metabolic and infectious diseases. Significant pharmacophores include the purine nucleus and many purine derivatives have even undergone preclinical or clinical testing. This Ph.D. thesis was initially focused on the preparation of new 2,6,9-trisubstituted purines and their characterization. The compounds were designed to show potential activity against PDGFR α and FLT3. These kinases are among tyrosine kinases often oncogenically activated in various cancer diseases. It has been found that an important structural motif for their inhibition is the presence of the 6-phenylaminopyrimidine moiety. Part of the work was also the characterization of biological effects of prepared substances on selected tumor lines, where antiproliferative activity and its association with inhibition of PDGFR α and FLT3 kinases were detected.

OBSAH

1.	CÍLE PI	ÍLE PRÁCE6		
2.	ÚVOD.			
3.	INHIBI	HIBITORY PROTEINOVÝCH KINAS		
4.	METOI	DY10		
4	.1. Syn	tetické metody 10		
	4.1.1.	Příprava aminů pro sérii FLT3 inhibitorů10		
	4.1.2.	Příprava N9-substituovaných derivátů purinu10		
	4.1.3.	Substituce na C611		
	4.1.4.	Substituce na C211		
4	.2. Bio	chemické metody 12		
	4.2.1.	Buněčné linie12		
	4.2.2.	Stanovení cytotoxicity12		
	4.2.3.	Test inhibice proteinkinas13		
	4.2.4.	Analýza buněčného cyklu 13		
	4.2.5.	Imunodetekce 14		
5.	VÝSLE	DKY 15		
5	.1. Syn	ıtéza15		
5	.2. Bio	logická aktivita nových inhibitorů PDGFRα16		
5	.3. Bio	logická aktivita nových inhibitorů FLT317		
6.	ZÁVĚR19			
7.	. LITERATURA			
8.	CURRICULUM VITAE			

1. CÍLE PRÁCE

Cíle předložené disertační práce byly stanoveny takto:

- syntéza nových inhibitorů proteinkinas na bázi 2,6,9-trisubstituovaných purinů,
- chemická charakterizace (struktura, identita, čistota) nově připravených látek,
- studium vztahu mezi strukturou a aktivitou těchto látek,
- studium mechanismu protinádorové aktivity připravených inhibitorů v modelových systémech *in vitro*.

2. ÚVOD

Díky deregulaci a mutacím proteinových kinas v mnoha lidských onemocněních se tato rodina enzymů stala za posledních dvacet let jedním z nejdůležitějších cílů léčiv. Za tuto dobu byly vyvinuty inhibitory více než 30 různých kinas, z nichž převážná část souvisí s rakovinou, imunologickými, neurologickými, metabolickými a infekčními onemocněními (Zhang *et al*, 2009).

Proteinové kinasy zprostředkovávají fosforylaci aminokyselinových zbytků v proteinech (serin, threonin, tyrosin) a modulují tím nejen přenos signálů, ale i mnoho dalších procesů včetně metabolismu, transkripce, progrese buněčného cyklu, přeskupení cytoskeletu a pohybu buněk, apoptosy a diferenciace (Manning, 2002). Popularita kinas je dána několika faktory. Za prvé lidský set proteinových kinas (kinom) se skládá z 518 proteinů dělících se do osmi rodin (AGC, CAMK, CKI, CMGC, STE, TK, TKL, RGC) a tvoří největší rodinu genů u eukaryot (Manning, 2002). Prakticky každá dráha přenášející signál v buňce je součástí složitější kaskády a jejich inhibice může vyvolat reálnou fyziologickou nebo léčebnou odpověď. Za druhé, i přes vysoký stupeň konzervativnosti ATP-vazebného místa prakticky všech proteinkinas, mohou být připraveny vysoce selektivní malé molekuly s výhodnými farmaceutickými vlastnostmi. Za třetí, inhibice aktivity kinas v normálních buňkách může být překvapivě tolerována, což představuje terapeutické okno pro selektivní ovlivnění nádorových buněk. Nicméně navzdory těmto skutečnostem se vývoj léčiv na této bázi setkává s problémy jako je nízká selektivita, nízká účinnost, absence zjevného konkrétního buněčného cíle u určité nemoci, případně také vznik specifické rezistence (Zhang *et al*, 2009).

3. INHIBITORY PROTEINOVÝCH KINAS

Naprostá většina dostupných inhibitorů proteinových kinas kompetují v aktivním místě s ATP. Kromě toho byly připraveny také inhibitory ireverzibilní, které bývají obvykle kovalentně vázány na nukleofilní cysteinové reziduum v blízkosti ATP-vazebného místa, což vede k zablokování ATP místa a ireverzibilní inhibici. Nové ATP kompetitory jsou nejčastěji vyvíjeny kombinací tří racionálních metod (Zhang *et al*, 2009): chemickými obměnami známých inhibitorů (analog synthesis), designem založeným na znalosti struktury vazebného místa proteinu (structure-informed design) a spojováním fragmentů interagujících ve vazebném místě (fragment-based assembly).

Reverzibilní inhibitory mohou být klasifikovány do čtyř hlavních tříd na základě konformace vazebného místa a DFG motivu. Inhibitory typu I jsou ATP-kompetitivní inhibitory, které se vážou na aktivní konformaci kinasy a vytváří vazbu s aspartátovým zbytkem DFG motivu směřujícího do aktivního místa kinasy. Inhibitory typu II se váží a stabilizují inaktivní konformaci kinasy vazbou na aspartátová residua DFG motivu, který vyčnívá směrem ven z ATP vazebného místa. Inhibitory typu III se váží do alosterické kapsy sousedící s ATP vazebným místem bez jakékoliv interakce s vazebným místem pro ATP, zatímco inhibitory typu IV se váží do alosterického místa, které je vzdálené od ATP-vazebného místa (Wu *et al*, 2015).

Jedním významným farmakoforem se stalo purinové jádro, které je nejhojněji používaným heterocyklem ve vývoji inhibitorů různých proteinů, včetně proteinkinas. Zavedením substituentů do polohy 2, 6, 8 a 9 se často výrazně mění způsob vazby, afinita a selektivita vůči různým proteinovým cílům (Sharma *et al*, 2016). Mnoho purinových derivátů se dostalo do preklinického nebo klinického testování a některé látky obsahující purinový skelet se již využívají jako léčiva, např. pro léčbu akutní leukémie (thiopuriny, pentostatin), jako antivirotika (acyklovir, penciklovir, ganciklovir), imunosupresiva (azathioprin), protinádorové látky (vidarabin) a broncholidátory (eofylin; Sharma *et al*, 2016).

Pokroky v návrhu a vývoji léků na bázi purinového skeletu inspirovaly rovněž paralelní vývoj strukturně příbuzných heterocyklických systémů, tzv. purinových isosterů, tedy strukturně podobných látek s různým počtem a uspořádáním dusíků (případně jiných heteroatomů) v jejich základním skeletu. Zvyšující se molekulární rozmanitost používající různé purinové isostery je ideální pro objev nových terapeutických činidel, které selektivně inhibují purin dependentní enzymy a receptory (Lim and Dolzhenko, 2014). Isostery se totiž mohou lišit ve fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je metabolická stabilita,

biodostupnost a farmakokinetické vlastnosti (Popowycz *et al*, 2009). Dalším faktorem, který výrazně přispívá k obměnám heteroatomů v centrálních heterocyklech, isosternímu nahrazování farmakoforů a syntéze analogů, je možnost ochrany duševního vlastnictví nových derivátů za účelem zhodnocení jejich komerční hodnoty.

V předložené disertační práci jsou v rámci jednotlivých kapitol popsány purinové inhibitory, případně látky s isosterním heterocyklem, které inhibují různé kinasy a jsou vyvinuty pro terapeutické účely. Jedná se o inhibitory tyrosinových kinas (FLT3, Mer, EGFR, Scr, Axl, Brc-Abl, Src-Abl, Bruton a Janusovy kinasy) a inhibitory serin/threoninových kinas (PAK, CK1, BRAF, CDK, PDK1, NEK2, GSK-3, aurora kinasa). Nicméně použití purinových inhibitorů se nevztahuje pouze na kinasy, ale i jiné proteinové cíle. Purinové deriváty našly uplatnění také jako inhibitory Hsp90 (Llauger et al, 2005; Chiosis et al, 2001), sulfotransferas (Chapman et al, 2002), fosfodiesteras (Pissarnitski et al, 2004; Pitts et al, 2004), AAK1 (Shahani et al, 2013), purinové nukleosidfosforylasy (Halazy et al, 1991), BRD9 (Picaud et al, 2015), 5'-nukleotidasy II (Cividini et al, 2015), leukotrien A4 hydrolasy (Penning et al, 2003), cysteinové proteasy kathepsinu K (Robichaud et al, 2003; Altmann et al, 2004), polymerizace mikrotubulů (myoseverin – (Chang et al, 2001), cholinesterasy (Schwarz et al, 2014) a troponin I-interagující kinasy (TNNI3K; Lawhorn et al, 2015). Dále se deriváty purinu dají použít jako induktory interferonu (Hirota et al, 2002; Kurimoto et al, 2004), ligandy adenosinových receptorů (Poulsen and Quinn, 1998; Perreira et al, 2005), modulátory CRH-R1 (Beck et al, 1999) a mimetika proteinu A (Zacharie et al, 2009).

4. METODY

4.1. Syntetické metody

4.1.1. Příprava aminů pro sérii FLT3 inhibitorů

4-fluor-nitrobenzen nebo 5-brom-2-nitropyridin (1 mmol), příslušný sekundární amin (1,05 mmol) a uhličitan draselný (2 mmol) v ethanolu (10 ml) byly v tlakové ampuli zahřívány při teplotě 100 °C po dobu 4 hodin pod argonovou atmosférou. Skončení reakce bylo kontrolováno pomocí TLC (chloroform:methanol, 19:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena rotační vakuovou odparkou (RVO) a odparek byl extrahován suspenzí dichlormethanu (25 ml) ve vodě (25 ml). Vodná fáze byla dvakrát extrahována dichlormethanem (25 ml) a spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou a vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncentrovány na RVO. Surový produkt byl použit pro následující reakce bez dalšího čištění.

Surový produkt (0,75 mmol) z předchozího kroku byl hydrogenován za atmosférického tlaku v methanolu (50 ml) za použití 5 % (w/v) paládia na aktivním uhlí (50 mg). Po spotřebování vodíku byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu, promyta methanolem a odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn ve 2 M kyselině chlorovodíkové (50 ml) a extrahován dichlormethanem (25 ml). Vodná fáze byla neutralizována 5% hydrogenuhličitanem sodným a sraženina byla odfiltrována a promyta vodou. Surový produkt byl vysušen v sušárně.

4.1.2. Příprava N9-substituovaných derivátů purinu

2,6-dichlor-9*H*-purin (15,8 mmol), příslušný alkohol (31,7 mmol) a trifenylfosfin (19,0 mmol) byly rozpuštěny v suchém tetrahydrofuranu a směs byla ochlazena na 0 °C. Za míchání byl pod argonovou atmosférou přidán diisopropylazodikarboxylát (36 mmol) a teplota byla udržována mezi 0-20 °C. Reakční směs byla míchána po dobu 2-4 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (petrolether:ethylacetát, 2:1). Reakční směs byla poté odpařena na RVO a odparek byl rozpuštěn ve vroucím toluenu (100 ml). Po ochlazení na pokojovou teplotu byl roztok inokulován malým množstvím trifenylfosfinoxidu a roztok byl poté ochlazen na 4 °C na dobu 24 hod. Poté byl

byl poté přečištěn sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1) (Zatloukal *et al*, 2013) (Gucký *et al*, 2013).

4.1.3. Substituce na C6

K suspenzi 9-substituovaného-2,6-dichlor-9*H*-purinu (6,25 mmol) ve směsi 40 ml *n*-propanolu a *N*,*N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (6,87 mmol) byl přidán příslušný amin (6,87 mmol). Suspenze byla za míchání zahřívána v tlakové ampuli při 120 °C. Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (petrolether:ethylacetát, 2:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a odparek byl extrahován mezi dichlormethanem (50 ml) a vodu (50 ml). Vodná fáze byla dvakrát extrahována dichlormethanem (25 ml) a spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou a vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncertovány na RVO. V případě potřeby byl surový produkt přečištěn sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1; Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013).

4.1.4. Substituce na C2

Látky z předchozí reakce o dostatečné čistotě byly předloženy spolu s *trans*-1,4diaminocyklohexanem v *n*-butanolu do tlakové ampule v případě konvenčního zahřívání nebo do kyvety určené pro mikrovlnou syntézu. Reakční směs byla zahřívána pod argonovou atmosférou při 160 °C po dobu 4-10 hodin nebo při teplotě 140-170 °C po dobu 0,5-1,5 hodiny za použití reaktoru CEM Discovery (**supplementary data přílohy II**). Reakce byla monitorována pomocí TLC až do jejího dokončení (chloroform:methanol, 9:1). Po ochlazení na laboratorní teplotu byla přidána voda (50 ml) a výsledná suspenze byla extrahována ethylacetátem (3 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (50 ml), solankou (50 ml), vysušeny bezvodým síranem sodným a zakoncentrovány na RVO. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (chloroform:methanol, 9:1; Zatloukal *et al*, 2013; Gucký *et al*, 2013).

Všechny experimenty používající mikrovlnné záření byly prováděny v mikrovlnném zařízení CEM-Discover. Reaktor se používá ve standardní konfiguraci s vlastním softwarem. Reakce byly prováděny ve skleněných vialkách o objemu 10 ml, které byly utěsněné silikonovým/PTFE uzávěrem, který mohl být vystaven maximálnímu tlaku 21 barů a teplotě

250°C. Teplota byla měřena infračerveným čidlem na vnějším povrchu vialky. Po ukončení reakce byla reakční vialka ochlazena na laboratorní teplotu proudem plynu.

4.2. Biochemické metody

4.2.1. Buněčné linie

Lidské nádorové linie byly získány z American Type Culture Collection nebo z Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH a byly kultivovány dle pokynů poskytovatele. Buněčné linie MCF-7, BT474, BJ, K562 byly kultivovány v DMEM médiu s 10 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 μ g/ml). Buněčné linie HCC827 a EOL-1 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 20 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 μ g/ml). Buněčné linie MV4-11, MOLM-13, THP-1, U937 byly kultivovány v médiu RPMI-1640 s 10 % fetálního hovězího séra, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 μ g/ml). Buněčná linie MRC-5 byla kultivována v EMEM médiu s 10 % fetálního hovězího séra, 1% NEAA, penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 μ g/ml). Všechnny buněčné linie byly kultivovány při 37 °C za přítomnosti 5 % CO₂. Použité buněčné linie vykazují různé alterace genů tyrosinových kinas.

4.2.2. Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxicity testovaných látek byly použity metody Calcein AM a MTT test. Buňky byly vysazeny do 96-jamkové mikrotitrační desky v množství 2-10 tisíc buněk na jamku (dle rychlosti proliferace) a po 24 hodinách byly ovlivněny požadovanými koncentracemi látek. Po 72 hodinové inkubaci byl přidán roztok Calceinu AM (výsledná koncentrace 1 µg/ml) a po 1 hod byla změřena fluorescence na destičkovém fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems) při 485/538 nm. V případě MTT testu byl po 72 hodinové inkubaci přidán roztok MTT (výsledná koncentrace 1 mg/ml) a po 4 hodinách byl vzniklý formazan rozpuštěn v DMSO. Poté byla stanovena absorbance při 570 nm pomocí destičkového spektrofotometru Infinite M200 PRO (Tecan). Z naměřených hodnot byly zkonstruovány grafy koncentrační závislosti přežívajících buněk (GraphPad Prism 5.0) a z nich interpolací určeny hodnoty GI₅₀, tedy koncentrace redukující počet viabilních buněk na 50 %.

4.2.3. Test inhibice proteinkinas

Aktivní kinasa CDK2/cyklin E byla produkována v hmyzích buňkách Sf9 pomocí bakulovirálního vektoru a byla purifikována na koloně NiNTA (Qiagen). PDGFRα, FLT3 WT, FLT3 ITD a FLT3 D835 byly zakoupeny od firmy ProQinase. Kinasový inhibiční test byl prováděn v 96-jamkové mikrotitrační desce s kulatým dnem. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a postupným vyřeďováním vodou byla připravena koncentrační řada jednotlivých látek s ředícím faktorem 5 v rozmezí 1 nM - 100 µM. Aktivita kinas byla měřena za použití vhodných substrátů (1 mg/ml AGLT (poly(Ala,Glu,Lys,Tyr) 6:2:5:1 hydrobromid) pro PDGFRα a 1 mg/ml histonu H1 pro CDK2) v přítomnosti 1 a 15 μM ATP pro PDGFRα a CDK2 (0,05 μ Ci [γ -³³P]ATP) a testovanou látkou v konečném objemu 10 μ l v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na-orthovanadát, 1.2 mM DTT, 2.5 µg / 50 µl PEG_{20.000}). Mikrotitrační destička byla umístěna do termostatu, kde byla inkubována při teplotě 30 °C na 30 minut. Poté byla reakce zastavena přidáním 5 µl 3% vodného roztoku kyseliny fosforečné. Z každé jamky bylo přeneseno 5 µl na fosfocelulosový papír P-81(Whatman). Po 5 minutách byl papír promyt 3x roztokem 0,5% kyseliny fosforečné a opláchnut 96% ethanolem. Kvantifikace aktivity ³³P byla provedena pomocí biomolekulárního digitálního analyzátoru FLA-7000 (Fujifilm). Z křivek závislosti fosforylace na koncetraci testovaných látek byly stanoveny hodnoty IC₅₀ pomocí programu GraphPad Prism (verze 5.0).

4.2.4. Analýza buněčného cyklu

Asynchronní buňky byly vysázeny do 96-jamkové desky a po preinkubaci byly ovlivněny testovanými sloučeninami po dobu 24 hodin. Adherentní buňky byly nejprve promyty PBS, trypsinizovány a ošetřeny roztokem inhibitoru trysinu (0,1%). Poté byl přidán 5x barvící roztok (17 mM citrát sodný, 0,5% IGEPAL® CA-630, 7,5 mM tetrahydrochlorid sperminu, 2,5 mM Tris, pH 7,6 obsahující 50 µg/ml propidium jodidu). Leukemické buňky byly barveny přímo pomocí 5x barvícího roztoku (tzn. bez trypsinizace). Obsah DNA buněk byl analyzován pomocí průtokové cytometrie za použití 488 nm laseru (BS FACS Verse se softwarem BD FAcSuite TM, verze 1.0.6). Distribuce buněčného cyklu byla analyzována za použití ModFit LT (Verity Software House, verze 4.1.7.). Pro korelaci změn buněčného cyklu s dalšími parametry byl vypočten poměr G1/G2-M pro každou buněčnou linii a látku

(při koncentraci odpovídající hodnotě GI₅₀) a vydělen poměrem G1/G2-M neovlivněných buněk. Tyto hodnoty byly zaznamenány jako relativní poměry G1/G2-M.

4.2.5. Imunodetekce

Buněčné lyzáty byly připraveny ze sklizených buněk v Laemliho pufru. Proteiny byly separovány na SDS-polyakrylamidových gelech a elektroblotovány na nitrocelulózovou membránu. Po blokování byly membrány přes noc inkubovány se specifickými primárními protilátkami, promyty a poté inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidasou. Poté byla peroxidasová aktivita detekována pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL (AP biotech) za použití CCD kamery LAS-4000 (Fujifilm).

5. PŘEHLED VÝSLEDKŮ

5.1. Syntéza nových inhibitorů PDGFRa a FLT3

Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných purinů vychází z komerčně dostupného 2,6-dichlorpurinu, který byl v prvním kroku alkylován v pozici *N9* prostřednictvím Mitsunobu alkylace (Mitsunobu *et al*, 1965; Lu *et al*, 2007). Kromě purinu a příslušného alkoholu se této reakce účastní dva reagenty, a to trifenylfosfin a diisopropyl azodikarboxylát (DIAD). Reakce byla udržována při 20-25 °C a v kombinaci s použitím nižšího ekvivalentu použitého DIAD (1,2 ekv.), trifenylfosfinu (1,2 ekv.) a kratší reakční doby byla omezena tvorba nežádoucího *N7* izomeru (Zatloukal, 2013). Nicméně produkt této reakce musel být přečištěn krystalizací a poté sloupcovou chromatografií ve všech případech.

Druhým krokem přípravy 2,6,9-trisubstituovaných purinů je nukleofilní substituce v pozici C6 purinu s příslušným anilinem nebo benzylaminem (Legraverend *et al*, 1999) (Kryštof *et al*, 2002). Většina použitých 4-substituovaných fenylaminů používaných pro tuto reakci byly komerčně dostupné, nicméně některé z těchto látek musely být připraveny dvoustupňovou syntézou vycházející z komerčně dostupného 4-bromnitrobenzenu a 2-brom-5-nitropyridinu. Nukleofilní substituce v C6 byla prováděna v *n*-propanolu za použití *N*, *N*-diisopropylethylaminu jako báze. Reakční teplota byla udržována v rozmezí 100-120 °C po dobu 3-6 hodin v závislosti na reaktivitě anilinu nebo benzylaminu. Surové produkty byly čištěny krystalizací nebo sloupcovou chromatografií (petrolether:ethylacetát, 2:1).

Finálním krokem syntézy byla nukleofilní substituce v poloze C2 purinu s velkým přebytkem *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (v případě látek **4a-4w**) či příslušných aminů (v případě látek **6a-80**). Tato reakce probíhala při 160 °C po dobu 4-20 h v olejové lázni v tlakové ampuli. Reakce byla prováděna standardně v olejové lázni, nicméně látky **4a-4w** (**příloha II**) byly syntetizovány zejména za použití mikrovlnného záření (**supplementary data přílohy II**). Jedná se o alternativní způsob zahřívání reakčních směsí, který může řešit problém s nehomogenním zahříváním u konvenčních technik. Mikrovlnné záření zvyšuje reakční kinetiku, rychlý počáteční ohřev a tím i lepší reakční rychlost, která ústí v čistší reakční produkty a vyšší výtěžky reakcí (Austin *et al*, 2002). V rámci této práce bylo potvrzeno, že mikrovlnné záření pomohlo radikálně snížit reakční čas, a to v některých případech až na třetinu z celkové doby. Finální látky, včetně všech intermediátů, byly identifikovány pomocí námi dostupných analytických metod (¹H NMR, ¹³C NMR, HPLC-MS, elementární analýza, bod tání).

5.2. Biologická aktivita nových inhibitorů PDGFRa

Trisubstituované puriny byly popsány i jako inhibitory tyrosinových kinas, zejména Src a Abl. Strukturně se jedná zejména o 6-anilinopuriny vykazující nanomolární inhibici uvedených kinas (O'Hare *et al*, 2004; Shakespeare *et al*, 2008). Systematické studie popisující účinky na receptorové TK však chybí, existuje pouze zmínka o inhibici FLT3 v patentech (Cheng *et al*, 2005). Z tohoto důvodu byla naše pozornost zaměřena na skupinu receptorových TK, a to konkrétně na FLT3 a jí příbuznou PDGFR α (Platelet-derived growth factor receptors α ; **příloha II**).

Jednou částí práce byla charakterizace biologických účinků série látek (**4a-4w**) s potenciální aktivitou na PDGFR α (**příloha II**). Byla studována inhibice CDK2 a PDGFR α všech finálních produktů (**tab.2** v **příloze II**). Na základě výsledků bylo potvrzeno, že výskyt fenylaminové skupiny v poloze *C6* je esenciální pro inhibici PDGFR α (IC₅₀<0,1 μ M); přítomnost této skupiny měla za následek významné zesílení účinku na PDGFR α v porovnání s látkami obsahující benzylový kruh. Na druhou stranu záměna anilinu za benzyl nikterak neovlivňovala inhibici CDK2. Nicméně nejpodstatnější strukturní změnou u této série byla volba jiných substituentů v poloze *N9* za účelem snížit aktivitu vůči CDK2 a přitom zachovat nebo zvýšit aktivitu proti PDGFR α . Známé purinové inhibitory CDK2 obsahují v této pozici obvykle isopropyl či cyklopentyl, který přispívá nemalou měrou k interakci s malou hydrofobní kapsou v CDK2 (Gray *et al*, 1998; Gucký *et al*, 2013). U série látek připravených v rámci této práce došlo k nahrazení jmenovaných substituentů za objemnější alkylové rozvětvené či nerozvětvené řetězce. Bylo zjištěno, že nejúčinnější inhibitory PDGFR α obsahují 4-5 uhlíkaté lineární nebo rozvětvené řetězce, delší řetězce již aktivitu snižovaly.

U všech nově připravených látek byla studována jejich antiproliferační aktivita na souboru 5 buněčných linií s různou expresí onkogenních tyrosinových kinas (HCC827, BT474, MCF7, K562, EOL-1; **tab.2** v **příloze II**). Látky byly aktivní na všech vybraných nádorových liniích, nicméně na linii EOl-1 byly nejúčinnější (GI₅₀ ~ 0,02-1,33 μ M). Tato linie je využívána jako *in vitro* model pro studium nových FIP1L1-PDGFRa inhibitorů, jelikož exprimuje *FIP1L1-PDGFRA* fúzi (Cools *et al*, 2004). Výsledky prokázané na buněčné úrovni na linii EOL-1 statisticky signifikantně korelovaly s inhibicí PDGFRa (**obr. 2** v **příloze II**). Domnívali jsme se, že silná inhibice PDGFRAα a zároveň cytotoxicita na EOL-1 by mohla souviset s *FIP1L1-PDGFRA* fúzním genem. Další experimenty byly proto navrženy tak, aby potvrdily tuto hypotézu. Nejprve byl studován efekt několika vybraných látek s různými aktivitami na buněčný cyklus na liniích EOL-1, HCC827 a K562 (**obr.3** v **příloze II**). Obecně lze říci, že CDK inhibitory způsobují G2-M blok nebo G1 i G2-M blok buněčného cyklu, zatímco inhibitory receptorových tyrosinkinas obvykle blokují buněčný cyklus v G1 fázi. Výsledky potvrdily, že nejcitlivější linie EOL-1, reagovala na látky G1 blokem, zatímco linie HCC827 a K562 vykazovaly G2-M blok. Na základě odlišných efektů na těchto liniích lze říci, že nejúčinnější látky v buňkách preferenčně inhibují PDGFR α , nicméně mohou interagovat i s jinými kinasami v případě, že tento cíl není přítomen.

Další část práce byla zaměřena na ověření mechanismu buněčného působení připravených inhibitorů PDGFR α (**obr.4** v **příloze II**). Bylo vybráno několik látek s různou mírou inhibice PDGFR α a tyto látky byly aplikovány ve dvou dávkách na buněčnou linii EOL-1. Následně byla sledována exprese proteinů signálních drah regulovaných PDGFR α , jako jsou STA3, ERK1/2 a MEK1/2, včetně jejich fosforylovaných forem. Nejúčinnější látky blokovaly fosforylaci STAT3 a ERK1/2 v obou použitých koncentracích, zatímco méně aktivní látky pouze při koncentraci vyšší. Pokles fosforylace MEK1/2 na serinech 217/221 byl zřejmý pouze u nejúčinnějších látek. Kromě toho byla potvrzena závislost inhibice autofosforylace PDGFR α (Tyr754, 849 a 1018) na koncentraci látky a potlačení signální dráhy u buněk ovlivněných nejúčinnější látkou.

5.3. Biologická aktivita nových inhibitorů FLT3

Vzhledem k tomu, že PDGFRa patří spolu s FLT3 do stejné rodiny RTK, mohou některé inhibitory inhibovat více členů této rodiny. Jako příklad lze uvést **crenolanib** (**CP-868,596**), který byl vyvinut jako selektivní a účinný inhibitor PDGFR α i β , nicméně vykazuje i vysokou afinitu k FLT3 (Zimmerman *et al*, 2013). Proto byly látky **4a-4w** podrobeny testování inhibice této receptorové kinasy. Antiproliferační účinky připravených látek byly testovány na buněčné linii MV4-11, která exprimuje FLT3-ITD mutaci, a proto je často využívaným *in vitro* modelem pro testování potenciálních inhibitorů FLT3 (Quentmeier *et al*, 2003). Z výsledků vyplývá, že všechny látky **4a-4w** vykazují cytotoxicitu s hodnotami GI₅₀ v rozmezí 3,98 μ M – 0,144 μ M. V porovnání s antiproliferační aktivitou na EOL-1 mají látky velmi analogický trend i v případě MV4-11, což může být dáno strukturní podobností těchto dvou kinas.

Další strukturní modifikací 2,6,9-trisubstituovaných purinů, která byla studována v rámci této práce, byla extenze substituentu v poloze N^6 , a to se zachovanou substitucí v polohách C2 a N9 kompatibilní s inhibicí CDK2. Tato modifikace výrazně a překvapivě

změnila profil cytotoxické aktivity připravených látek. Schopnost inhibovat CDK sice zůstala zachována, ale přitom se významně omezila cytotoxicita vůči naprosté většině nádorových buněčných linií. Vysoká cytotoxická účinnost zůstala zachována pouze vůči linii MV4-11, odvozené od akutní myeloidní leukemie, která exprimuje onkogenní variantu FLT3-ITD. Další skupinou látek byly látky **6a-80**, které byly připraveny jako potenciální inhibitory FLT3 (**příloha III**).

Nejúčinnější látky byly testovány na panelu devíti buněčných liniích s různým histologickým původem (**tab. 5** v **příloze III**). Látky vykazovaly nanomolární aktivitu na linii MOLM-13 (FLT3-ITD pozitivní linie), nicméně na jiných rakovinných buněčných liniích byly hodnoty GI₅₀ v mikromolárních koncentracích, což potvrdilo vysokou selektivitu látek vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám. Linie jako Kasumi-1 a HCC-827, které nesou aktivační mutaci v c-Kit a aktivační deleci v EGFR, vykazovaly submikromolární citlivost na látky **7a-7e**. Důležité ale je, že netransformované lidské buňky MRC-5, HUVEC a neproliferující buňky BJ, nebyly těmito látkami ovlivněny ani při koncentraci 1 000 krát vyšší než byly koncentrace použité na buňky MV4-11 a MOLM-13.

Molekulární mechanismus působení připravených inhibitorů FLT3 byl studován v buněčné linii MV4-11 (**příloha III**). MV4-11 buňky byly ovlivněny kandidátní látkou **7d** o různých koncentracích po dobu 1 hodiny. Následné analýzy proteinů souvisejících se signalizací Flt3 ukázaly, že i koncentrace 1 nM byly dostatečné pro inhibici autofosforylace receptoru FLT3 na třech tyrosinových zbytcích (589, 591 a 842). Navíc tato inhibice potlačila aktivitu několika podřízených proteinů (STAT5, ERK1/2 a MEK1/2; **obr. 1** v **příloze III**). Vzhledem k tomu, že signální dráhy MAPK a STAT jsou regulátory proliferace buněk, jejich inhibice vedla dle očekávání k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Látka **7d** indukovala masivní zástavu v G1 fázi již při koncentraci 1 nM. Při vyšších koncentracích přibývalo výrazně také apoptotických buněk (**obr. 2a** v **příloze III**). Jejich nárůst odpovídal také zjištěné fragmentaci proteinu PARP-1, který je během apoptózy specificky štěpen kaspasami 3 a 7 (Kaufmann *et al*, 1993). Toto štěpení bylo navíc doprovázeno sníženými hladinami antiapoptotického proteinu Mcl-1 (**obr. 2b** v **příloze III**; Kojima *et al*, 2010; Lin *et al*, 2014).

6. ZÁVĚR

První část předložené disertační práce byla věnována syntéze nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů s potenciální aktivitou na PDGFRα a FLT3. Tyto látky byly připraveny na základě předchozích zkušeností a znalostí z literatury, a tak došlo k cíleným modifikacím pozic 2, 6 a 9 purinového skeletu za účelem modulace jejich biologických vlastností a zvýšení jejich selektivity vůči příslušným kinasam. Výsledkem byly dvě série látek, a to inhibitorů PDGFRα (23 látek) a inhibitorů FLT3 (49 látek). Všechny připravené látky, včetně meziproduktů, byly charakterizovány s použitím dostupných analytických metod.

Druhou částí disertační práce bylo studium inhibičních a antiproliferačních vlastností připravených látek. Série PDGFR α inhibitorů vykazovaly nanomolární inhibiční aktivity proti PDGFR α a silnou a selektivní cytotoxicitu na lidské eosinofilní leukemické buněčné linii EOL-1, která exprimuje onkogenní kinasu FIP1L1-PDGFRA. Cytotoxicita látek v EOL-1 silně korelovala s inhibicí PDGFR α . Látky kromě toho vykazovaly inhibici autofosforylace PDGFR α a potlačovaly tak její signální dráhu. Některé sloučeniny ze série FLT3 inhibitorů vykazovaly taktéž nanomolární aktivitu proti buněčným liniím akutní myeloidní leukémie s onkogenní variantou FLT3. Nejúčinnější látka **7d** inhibovala autofosforylaci FLT3 a deaktivovala jeho signální dráhu, což vedlo k zastavení buněčného cyklu a indukci apoptosy u linie MV4-11. Další experimenty potvrdily, že testovaná látka indukovala inhibici FLT3 také v podmínkách *in vivo*.

V rámci této práce bylo prokázáno, že přítomnost 6-fenylaminové skupiny v pozici C6 purinu má pozitivní vliv pro inhibici kinas PDGFRα a FLT3 a zároveň byla zjištěna selektivní cytotoxicita na leukemických liniích EOL-1 a MV4-11. Na základě těchto výsledků je možné tyto látky použít jako strukturní motivy pro návrh nových látek s lepšími biologickými vlastnostmi a s potenciálním terapeutickým využitím.

7. LITERATURA

- Altmann E, Cowan-Jacob SW, Missbach M (2004). Novel purine nitrile derived inhibitors of the cysteine protease cathepsin K. J Med Chem 47: 5833–5836.
- Austin RE, Okonya JF, Bond DRS, Al-Obeidi F (2002). Microwave-assisted solid-phase synthesis (MASS) of 2,6,9-trisubstituted purines. *Tetrahedron Lett* **43**: 6169–6171.
- Beck JP, Arvanitis AG, Curry MA, Rescinito JT, Fitzgerald LW, Gilligan PJ, *et al* (1999). Purin-8ones as corticotropin-releasing hormone (CRH-R1) receptor antagonists. *Bioorganic Med Chem Lett* **9**: 967–972.
- Cividini F, Pesi R, Chaloin L, Allegrini S, Camici M, Cros-Perrial E, *et al* (2015). The purine analog fludarabine acts as a cytosolic 5'-nucleotidase II inhibitor. *Biochem Pharmacol* 94: 63–68.
- Cools J, Quentmeier H, Huntly BJP, Marynen P, Griffin JD, Drexler HG, *et al* (2004). The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFRA-positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* **103**: 2802–2805.
- Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, *et al* (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, *et al* (2013). A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Med Chem* **56**: 6234–6247.
- Halazy S, Ehrhard A, Danzin C (1991). 9-(Difluorophosphonoalkyl)guanines as a New Class of Multisubstrate Analogue Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. J Am Chem Soc 113: 315–317.
- Hirota K, Kazaoka K, Niimoto I, Kumihara H, Sajiki H, Isobe Y, *et al* (2002). Discovery of 8-hydroxyadenines as a novel type of interferon inducer. *J Med Chem* **45**: 5419–5422.
- Chang YT, Wignall SM, Rosania GR, Gray NS, Hanson SR, Su AI, et al (2001). Synthesis and biological evaluation of myoseverin derivatives: Microtubule assembly inhibitors. J Med Chem 44: 4497–4500.
- Chapman E, Ding S, Schultz PG, Wong CH (2002). A potent and highly selective sulfotransferase inhibitor. *J Am Chem Soc* **124**: 14524–14525.
- Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, *et al* (2001). A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* **8**: 289–299.
- Imbach P, Capraro HG, Furet P, Mett H, Meyer T, Zimmermann J (1999). 2,6,9-Trisubstituted purines: Optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett* **9**: 91–96.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Res* **53**: 3976–3985.
- Kojima K, Konopleva M, Tsao T, Andreeff M, Ishida H, Shiotsu Y, *et al* (2010). Selective FLT3 inhibitor FI-700 neutralizes Mcl-1 and enhances p53-mediated apoptosis in AML cells with activating mutations of FLT3 through Mcl-1/Noxa axis. *Leukemia* **24**: 33–43.
- Kryštof V, Lenobel R, Havlíček L, Kuzma M, Strnad M (2002). Synthesis and biological activity of Olomoucine II. *Bioorganic Med Chem Lett* 12: 3283–3286.

- Kurimoto A, Ogino T, Ichii S, Isobe Y, Tobe M, Ogita H, et al (2004). Synthesis and evaluation of 2substituted 8-hydroxyadenines as potent interferon inducers with improved oral bioavailabilities. *Bioorganic Med Chem* 12: 1091–1099.
- Lawhorn BG, Philp J, Zhao Y, Louer C, Hammond M, Cheung M, *et al* (2015). Identification of Purines and 7-Deazapurines as Potent and Selective Type i Inhibitors of Troponin I-Interacting Kinase (TNNI3K). *J Med Chem* **58**: 7431–7448.
- Legraverend M, Ludwig O, Bisagni E, Leclerc S, Meijer L, Giocanti N, *et al* (1999). Synthesis and in vitro evaluation of novel 2,6,9-trisubstituted purines acting as cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **7**: 1281–1293.
- Lim FPL, Dolzhenko A V. (2014). 1,3,5-Triazine-based analogues of purine: From isosteres to privileged scaffolds in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem* **85**: 371–390.
- Lin WH, Yeh TK, Jiaang WT, Yen KJ, Chen CH, Huang CT, *et al* (2014). Evaluation of the antitumor effects of BPR1J-340, a potent and selective FLT3 inhibitor, alone or in combination with an HDAC inhibitor, vorinostat, in AML cancer. *PLoS One* **9**: .
- Llauger L, He H, Kim J, Aguirre J, Rosen N, Peters U, *et al* (2005). Evaluation of 8-arylsulfanyl, 8arylsulfoxyl, and 8-arylsulfonyl adenine derivatives as inhibitors of the heat shock protein 90. J Med Chem 48: 2892–2905.
- Lu W, Sengupta S, Petersen JL, Akhmedov NG, Shi X (2007). Mitsunobu coupling of nucleobases and alcohols: An efficient, practical synthesis for novel nonsugar carbon nucleosides. *J Org Chem* **72**: 5012–5015.
- Manning G (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science (80-) 298: 1912–1934.
- Mitsunobu O, Obata T, Mukaiyama T (1965). Preparation of Esters of Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *J Org Chem* **30**: 1071–1073.
- Penning TD, Chandrakumar NS, Desai BN, Djuric SW, Gasiecki AF, Malecha JW, *et al* (2003). Synthesis of imidazopyridines and purines as potent inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. *Bioorganic Med Chem Lett* **13**: 1137–1139.
- Perreira M, Jiang J-K, Klutz AM, Gao Z-G, Shainberg A, Lu C, *et al* (2005). "Reversine" and its 2-substituted adenine derivatives as potent and selective A3 adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* **48**: 4910–8.
- Picaud S, Strocchia M, Terracciano S, Lauro G, Mendez J, Daniels DL, *et al* (2015). 9 H -purine scaffold reveals induced-fit pocket plasticity of the brd9 bromodomain. *J Med Chem* **58**: 2718–2736.
- Pissarnitski DA, Asberom T, Boyle CD, Chackalamannil S, Chintala M, Clader JW, *et al* (2004). SAR development of polycyclic guanine derivatives targeted to the discovery of a selective PDE5 inhibitor for treatment of erectile dysfunction. *Bioorganic Med Chem Lett* **14**: 1291–1294.
- Pitts WJ, Vaccaro W, Huynh T, Leftheris K, Roberge JY, Barbosa J, *et al* (2004). Identification of purine inhibitors of phosphodiesterase 7 (PDE7). *Bioorganic Med Chem Lett* **14**: 2955–2958.
- Popowycz F, Fournet G, Schneider C, Bettayeb K, Ferandin Y, Lamigeon C, *et al* (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.
- Poulsen S a, Quinn RJ (1998). Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem* **6**: 619–641.

- Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M, Drexler HG (2003). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 17: 120–124.
- Robichaud J, Oballa R, Prasit P, Falgueyret J-P, Percival MD, Wesolowski G, *et al* (2003). A novel class of nonpeptidic biaryl inhibitors of human cathepsin K. *J Med Chem* **46**: 3709–27.
- Shahani VM, Ball DP, Ramos A V., Li Z, Spagnuolo PA, Haftchenary S, *et al* (2013). A 2,6,9-heterotrisubstituted purine inhibitor exhibits potent biological effects against multiple myeloma cells. *Bioorganic Med Chem* **21**: 5618–5628.
- Sharma S, Singh J, Ojha R, Singh H, Kaur M, Bedi PMS, *et al* (2016). Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **112**: 298–346.
- Schwarz S, Csuk R, Rauter AP (2014). Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Org Biomol Chem* **12**: 2446–56.
- Wu P, Nielsen TE, Clausen MH (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **36**: 422–439.
- Zacharie B, Fortin D, Wilb N, Bienvenu JF, Asselin M, Grouix B, *et al* (2009). 2,6,9-Trisubstituted purine derivatives as protein A mimetics for the treatment of autoimmune diseases. *Bioorganic Med Chem Lett* **19**: 242–246.
- Zatloukal M, Jorda R, Gucky T, Reznickova E, Voller J, Pospisil T, *et al* (2013). Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **61**: 61–72.
- Zhang J, Yang P, Gray N (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9**: 28–39.
- Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J, Hu S, Orwick S, Roberts MS, *et al* (2013). Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood* **122**: 3607–3615.

8. CURRICULUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno:	Veronika Malínková				
Datum narozer	ní: 11.8. 1989 v Olomouci				
Bydliště:	Příkazy 254, 783 33 Příkazy				
Vzdělání:					
2013 - nyní	Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta				
	obor: Biochemie – doktorské studium				
2011 - 2013	Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta				
	obor: Biochemie – magisterské studium				
2009 2011	$\mathbf{U}_{1} = \mathbf{U}_{1} $				

2008 - 2011 Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta *obor*: Biochemie – bakalářské studium

Pedagogická činnost:

Cvičení z buněčné biologie (LRR/BUBCV) – zimní semestr Vybrané kapitoly z organické a analytické chemie (LRR/OACH) – letní semestr

Chemie pro biology 2 (LRR/CHPB2) – letní semestr

Zahraniční stáž:

Univerzita:	De Montfort University
Fakulta:	Health and Life Sciences
Oddělení:	School of Allied Health Sciences
Místo:	Leicester, Anglie
Vedoucí:	Dr Avninder S Bhambra
Termín konáni:	červenec-říjen 2016
Problematika:	Syntéza racionálně navržených látek s biologickou aktivitou
	(protinádorová, antitrypanosomální)

Seznam publikovaných prací:

Publikované články:

- Malínková V, Vylíčil J & Kryštof V (2015). Cyclin-dependent kinase inhibitors for cancer therapy: a patent review (2009 – 2014). Expert Opinion on Therapeutic Patents 25, 953–970.
- Malínková V, Řezníčková E, Jorda R, Gucký T, Kryštof V (2017). Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα and their antileukemic activity in the human eosinophilic cell linenEOL-1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. doi: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.032.

Práce v recenzním řízení:

Gucký T, Řezníčková E, Radošová Muchová T, Jorda R, Klejová Z. Malínková V, et al (2017). Discovery of N²-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N⁶-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*.

Konferenční příspěvky:

- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-based development of PAK and MER inhibitors. Konference chemické biologie a genetiky, 2. - 4. března 2014, Kouty nad Desnou, Česká Republika; přednesený příspěvek.
- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-based development of PAK and MER inhibitors. Konference 50th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry "Liblice 2015", 6. - 8. listopadu, Olomouc, Česká Republika; poster.
- Malínková V, Jorda R, Kryštof V. Structure-activity relationships for novel purine inhibitors of PAK4. Konference Growth Regulators on the Way 2016, 3. - 5. března 2016, Malá Morávka, Česká Republika; přednesený příspěvek.
- Malínková V, Řezníčková E, Jorda R, Kryštof V. Trisubstituted purine inhibitors of PDGFRα with high selectivity toward human eosinophilic cell line EOL-1. Konference Chemistry and biology of phytohormones and related substances 2017, 21. - 23. května 2017, Kouty nad Desnou, Česká Republika; přednesený příspěvek.