

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Charakterizace protinádorových a protizánětlivých účinků  
nových nízkomolekulárních inhibitorů  
cyklin-dependentních kinas**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor:	Mgr. Ladislava Vymětalová
Vedoucí disertační práce:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, PhD.
Studijní program:	P1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie

*„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“*

V Olomouci dne

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému školiteli doc. Kryštofovi za jeho všestrannou pomoc, podnětné diskuze, rady i kritické připomínky, které mi pomohly stvořit toto dílo. Dále jsem velmi vděčná, že jsem mohla začít rozvíjet své odborné zaměření právě v Laboratoři růstových regulátorů, kde jsem strávila několik let a poznala mnoho zajímavých lidí. Především Eva Řezníčková se stala mým part'ákem ve vědeckém boji, a proto i jí patří právě tady můj nemalý dík.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Mgr. Ladislava Vymětalová
Název práce	Charakterizace protinádorových a protizánětlivých účinků nových nízkomolekulárních inhibitorů cyklin-dependentních kinas
Typ práce	disertační
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	Cyklin-dependentní kinasy (CDK) regulují četné buněčné procesy, ovšem do povědomí vstoupily především jako regulátory buněčného cyklu. Poznávání molekulární podstaty nádorových onemocnění postupně odhalilo aberace ve struktuře či množství těchto enzymů vedoucí k deregulaci jejich aktivity. Z toho důvodu se CDK staly novým cílem protinádorových terapií. V rámci této práce byla provedena literární rešerše zabývající se vývojem inhibitorů CDK a konceptem syntetické letality, který by mohl pomoci při léčbě nádorových onemocnění. Jelikož je rakovina často úzce spjata s poruchami imunitního systému, byla část práce věnována zánětlivým chorobám, jejichž vznik je mnohdy spojený s nesprávnou funkcí či prodlouženou životností neutrofilů. V praktické části byly popsány účinky nových pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidinových inhibitorů CDK na nádorové linie, a navíc byl navržen i mechanismus jejich působení. Dále byl studován vliv nových inhibitorů na funkce neutrofilů a rovněž byl odhalen princip jejich účinků.
Klíčová slova	CDK, RNA polymerasa II, Mcl-1, neutrofil
Počet stran	98
Počet příloh	4
Jazyk	český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Mgr. Ladislava Vymětalová
Title	Characterization of antitumor and antiinflammatory effects of novel cyclin-dependent kinase inhibitors
Type of thesis	Ph.D.
Department	Laboratory of Growth Regulators Faculty of Science Palacký University & Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2016
Abstract	Cyclin-dependent kinases (CDK) control several cell processes but they are known especially as cell cycle regulators. Discovering of molecular principle of cancer has gradually revealed aberrations in the structure or amount of these enzymes leading to a deregulation of their activity. Hence, CDK came to the fore of many scientists and became a novel antitumor target. This study describes the development of CDK inhibitors and the concept of synthetic lethality which could help in anticancer therapies. Since a cancer is often linked to defects in immune system, a part of this dissertation was focused on inflammatory diseases which frequently arise from abnormal functions or prolonged viability of neutrophils. In practical section the effects of novel pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidines on cancer cell lines were understated and the mechanism of their action was suggested. Further, an action of novel inhibitors on neutrophil functions was assessed and the principle of their activity was discovered.
Keywords	CDK, RNA polymerase II, Mcl-1, neutrophil
Number of pages	98
Number of appendices	4
Language	Czech

## Obsah

Bibliografická identifikace.....	- 3 -
Bibliographical identification.....	- 4 -
Obsah .....	- 5 -
Cíle práce .....	- 7 -
1. Úvod.....	- 8 -
2. Cyklin-dependentní kinasy (CDK).....	- 10 -
2.1. Regulace buněčného cyklu .....	- 10 -
2.2. Regulace transkripce.....	- 11 -
2.3. Další funkce CDK.....	- 13 -
2.4. Struktura CDK a regulace jejich aktivity.....	- 14 -
2.5. Deregulace CDK.....	- 17 -
2.6. Inhibice CDK.....	- 19 -
2.6.1. Počátky vývoje CDK inhibitorů .....	- 19 -
2.6.2. CDK inhibitory druhé generace.....	- 23 -
2.7. Charakterizace funkcí CDK pomocí genetických modelů.....	- 27 -
3. Využití syntetické letality pro optimalizaci protinádorových terapií.....	- 29 -
3.1. CDK jako synteticky letální partneři jiných genů.....	- 31 -
4. Protein Mcl-1, regulátor apoptosy.....	- 34 -
5. Neutrofilý, základní složky imunitní odpovědi.....	- 38 -
5.1. Zrání, mobilizace a aktivace neutrofilů .....	- 38 -
5.2. Eliminace škodlivých faktorů .....	- 39 -
5.3. Konečná fáze zánětlivé reakce.....	- 40 -
5.4. Patologická aktivita neutrofilů u některých zánětlivých onemocnění .....	- 41 -
5.5. Léčba zánětlivých a autoimunitních onemocnění.....	- 43 -
6. Metody.....	- 46 -
6.1. Analýza buněčného cyklu .....	- 46 -
6.2. Imunofluorescence.....	- 46 -
6.3. Stanovení cytotoxicity .....	- 46 -
6.4. Test inhibice proteinkinas .....	- 47 -
6.5. SDS-PAGE a imunodetekce .....	- 47 -
6.6. Sledování aktivity kaspas 3 a 7.....	- 47 -
6.7. RNA interference .....	- 48 -

6.8. Měření RNA syntézy .....	- 48 -
6.9. Izolace a kultivace lidských neutrofilů .....	- 48 -
6.10. Stanovení tvorby ROS neutrofilů.....	- 49 -
6.11. Sledování apoptosy neutrofilů .....	- 49 -
6.12. Posouzení jaderné morfologie neutrofilů.....	- 49 -
6.13. Test migrace neutrofilů .....	- 49 -
7. Diskutované výsledky .....	- 51 -
8. Závěr.....	- 63 -
9. Reference.....	- 64 -
10. Seznam použitých zkratk.....	- 92 -
11. Curriculum vitae.....	- 96 -
12. Seznam příloh.....	- 98 -

## **Cíle práce**

Cílem předkládané práce bylo podat přehled o struktuře a funkcích CDK s důrazem na jejich deregulaci u mnoha nádorových onemocnění. Pravděpodobně nejjednodušším a nejefektivnějším způsobem potlačení aktivity těchto enzymů je aplikace nízkomolekulárních inhibitorů, a proto bylo dalším záměrem této disertace shrnout historii jejich vývoje od prvotních substancí izolovaných z přírodních materiálů až po nové převážně uměle vytvořené sloučeniny. Z praktického hlediska bylo cílem otestovat nové trisubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny na několika nádorových buněčných liniích a lidských neutrofilech, popsat vztahy mezi jejich strukturou a aktivitou a prostudovat mechanismus jejich buněčných účinků.

## 1. Úvod

Nádorová onemocnění patřící k nejobtížněji léčitelným chorobám jsou zároveň jednou z nejčastějších příčin úmrtí a staví se celosvětově do centra zájmu mnoha vědeckých skupin. První poznatky o existenci těchto onemocnění se datují do konce 18. století, kdy byla popsána rakovina šourku u kominíků a byla též naznačena souvislost jejího vzniku s výskytem toxických látek v sazích.<sup>1</sup> Objev rentgenového záření v následujícím století a jeho nadměrné užívání vyvolalo rakovinu u několika vědců, mezi které patřila zřejmě i Marie Curie-Sklodowska.<sup>2</sup> Mezi další raný, avšak z genetického hlediska velmi cenný objev, se řadí identifikace viru vyvolávajícího vznik sarkomů u kuřat.<sup>3</sup> Během minulého století byla identifikována celá škála dalších nádorových onemocnění a byly naznačeny možné příčiny jejich vzniku. Komplexnímu porozumění molekulárních mechanismů maligní transformace však napomohly až moderní biologické přístupy a nové technologie, které stojí také za výrazným pokrokem v léčbě těchto původně obskurních chorob.

Tumorigeneze představuje často mnohostupňový proces, kdy díky akumulaci genetických změn podporujících růst dochází k progresivní přeměně normální buňky v nádorovou. Sled a kombinace těchto mutací jsou náhodné, což vysvětluje nezměrnou rozmanitost nádorových onemocnění. V časovém měřítku se jedná převážně o dlouhotrvající děj, o čemž svědčí i vysoká incidence zhoubných chorob u starších lidí. Ačkoli může tumorigeneze postihnout prakticky jakoukoli tkáň, lze u všech typů nádorů vysledovat několik společných znaků. Podle teorie jsou maligní buňky nezávislé na příjmu růstových signálů z okolního prostředí, necitlivé k signálům blokujícím růst, nepodléhají programované buněčné smrti, neboli apoptose, mají neomezený replikační potenciál, podporují angiogenezi a tvoří metastázy.<sup>4</sup> Ačkoli díky těmto vlastnostem získávají nově transformované buňky onkogenní potenciál, lze využít právě tyto atributy během léčby pro selektivní zacílení.

Počátky terapií nádorů spočívaly v chirurgické zásahu a aplikaci ionizujícího záření či chemoterapeutik. Třebaže jsou tyto přístupy stále hojně využívány a mohou být efektivní u včasně diagnostikovaných malignit, zdá se nezbytné hledat nové účinnější přístupy, které specificky postihnou dané onemocnění a budou mít méně vedlejších účinků. Identifikace deregulovaných buněčných procesů a jejich komponent poskytuje cenné informace sloužící jako templát pro design nových efektivních biologických terapií. Pomocí nízkomolekulárních látek lze zasáhnout poškozené



kontrolní mechanismy a vyvolat apoptosu nádorových buněk. Jedním z takových cílů jsou cyklin-dependentní kinasy (CDK) známé jako regulátory buněčného cyklu, které budou detailněji popsány v hlavní části této práce. Inhibice jejich aktivity byla prokázána jako velmi účinná protinádorová strategie a během posledních 25 let bylo nasyntetizováno mnoho sloučenin s inhibičním potenciálem vůči CDK. Několik látek dokonce postoupilo do klinických zkoušek, kde jsou aplikovány na různá nádorová onemocnění jak monoterapeuticky tak v kombinaci s klasickými cytostatiky. Laboratoř růstových regulátorů stála jakožto mateřské pracoviště za objevem klinicky testovaného CDK inhibitoru s názvem roskovitin a stále se, kromě jiných vědeckých zaměření, intenzivně věnuje vývoji CDK inhibitorů a jejich uplatnění v léčbě maligních onemocnění. Předkládaná práce popisuje potenciální využití derivátů roskovitinu při léčbě některých malignit, přičemž se opírá i o experimentální zjištění.

Inhibice CDK aktivity může být ovšem využita v širším spektru chorob. Bylo zjištěno, že za vznikem a rozvojem chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění stojí extrémně dlouhé přežívání neutrofilů, které jsou nadměrně aktivovány a reagují vůči antigenům těla vlastním. V konečném důsledku pak dochází k nevratnému poškození tkání a v extrémních případech jsou tato onemocnění i smrtelná. Několik studií prokázalo, že viabilita neutrofilů může být snížena aplikací nízkomolekulárních CDK inhibitorů, což podnítilo i naše snahy o nové uplatnění derivátů roskovitinu.<sup>5-7</sup> Ve spolupráci s britskou skupinou prof. Janet Lord (University of Birmingham) se nám podařilo objasnit mechanismus účinku CDK inhibitorů v indukci apoptosy neutrofilů izolovaných z krve zdravých dárců a neutrofilů, u kterých byl simulován patologický stav.

## 2. Cyklin-dependentní kinasy (CDK)

CDK se obecně řadí do třídy enzymů nazývaných transferasy, které katalyzují fosforylaci proteinů, což může vést ke změně jejich lokalizace, enzymové aktivity či interakce s jinými biomolekulami. Jedná se tudíž o klíčové signální molekuly, jejichž změny ve struktuře jakožto i v množství často způsobují maligní transformaci. V lidském genomu je celkově obsaženo 518 proteinkinás, z nichž bylo 21 identifikováno právě jako CDK, a navíc bylo popsáno dalších 5 genů kódujících CDKL (CDK-like kinase).<sup>8</sup> Ačkoli byly CDK zpočátku popsány jako regulátory buněčného růstu a dělení, jejich funkce jsou daleko obširnější. Kontrolují totiž celou řadu dalších biologických procesů včetně transkripce, metabolismu nebo diferenciaci neuronů.

### 2.1. Regulace buněčného cyklu

Během průchodu buněčným cyklem dochází k sekvenční aktivaci několika typů CDK, a to CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 a CDK6. Vzhledem ke konstantní expresi všech typů CDK během buněčného dělení je zřejmé, že správné načasování aktivace jednotlivých CDK musí být zajištěno jiným mechanismem. Jedná se o interakci s proteinovými podjednotkami, které jsou pravidelně syntetizovány a degradovány pouze v určitých fázích cyklu, a dostaly tudíž název cykliny. U dormantních či terminálně diferencovaných buněk v G<sub>0</sub> fázi je vstup do G<sub>1</sub> řízen komplexem CDK3/cyklin C, který fosforyluje Ser807/Ser811 pRb (retinoblastoma protein).<sup>9</sup> Mitogenní signály z okolí posléze zapínají expresi cyklinů D (1,2,3) stimulujících po vazbě na CDK4/CDK6 další fosforylaci pRb vedoucí k částečné inaktivaci jeho funkce jako transkripčního represoru a rekonformaci transkripčního faktoru E2F.<sup>10</sup> Jedním z následně transkribovaných proteinů je cyklin E aktivující CDK2, která poté hyperfosforyluje pRb, což má za následek kompletní uvolnění E2F a jeho maximální působení jako transkripčního faktoru. V tomto tzv. restričním bodě přestávají být buňky závislé na mitogenních signálech a postupují do S fáze, kde se komplex CDK2/cyklin E účastní replikace DNA, duplikace a maturace centrosomu a fosforyluje též proteiny modifikující histony. Po zahájení replikace je cyklin E rychle degradován a CDK2 interaguje s nově exprimovaným cyklinem A, který se později váže i na CDK1. Oba komplexy se podílejí na ukončení S fáze, přičemž v G<sub>2</sub> fázi je cyklin A degradován a nahrazen nově syntetizovanými cykliny B (1,2,3). Do přechodu mezi G<sub>2</sub> a M fází

se zapojuje CDK10 s cyklinem M, a to prostřednictvím fosforylace Ets2 (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2), který je posléze degradován proteasomem.<sup>11,12</sup> V důsledku dochází ke snižování exprese několika regulátorů mitosy, včetně AURKA (Aurora kinase A) a AURKB.<sup>13</sup> Komplex CDK10/cyklin M tak slouží jako nádorový supresor, který brání vzniku aberací v počtu centrosomů a následně defektům v buněčném dělení.<sup>14</sup> V M fázi řídí jednotlivé B cykliny ve spojení s CDK1 rozpad jaderné membrány, kondenzaci chromosomů i tvorbu mitotického vřeténka. Cykliny B jsou poté ubiquitinylovány APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) a degradovány v proteasomu.

Poměrně nedávno bylo zjištěno, že CDK14 (PFTK1) interagující s cyklinem Y a tzv. 14-3-3 proteiny reguluje Wnt (wingless/int-1) signalizaci, jejíž funkce ovlivňuje průchod buněčným cyklem.<sup>15,16</sup> CDK14 totiž fosforyluje LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6) podílející se na tvorbě mitotického vřeténka prostřednictvím proteinu Dvl2 (Dishevelled 2) a nádorového supresoru APC (adenomatous polyposis coli), který zajišťuje napojení mikrotubulů na kinetochory.<sup>17,18</sup> Wnt signalizace je ovšem klíčová též během G1 fáze, kdy její aktivita blokuje funkci GSK3 (glycogen synthase kinase 3), a tím podporuje transkripci *c-myc* (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) závislou na  $\beta$ -catenin.<sup>19</sup> C-Myc jakožto transkripční faktor indukuje expresi cyklinu D a zároveň potlačuje produkci přirozených inhibitorů CDK p21 a p27 (viz. dále), čímž podněcuje buněčné dělení.<sup>20-22</sup>

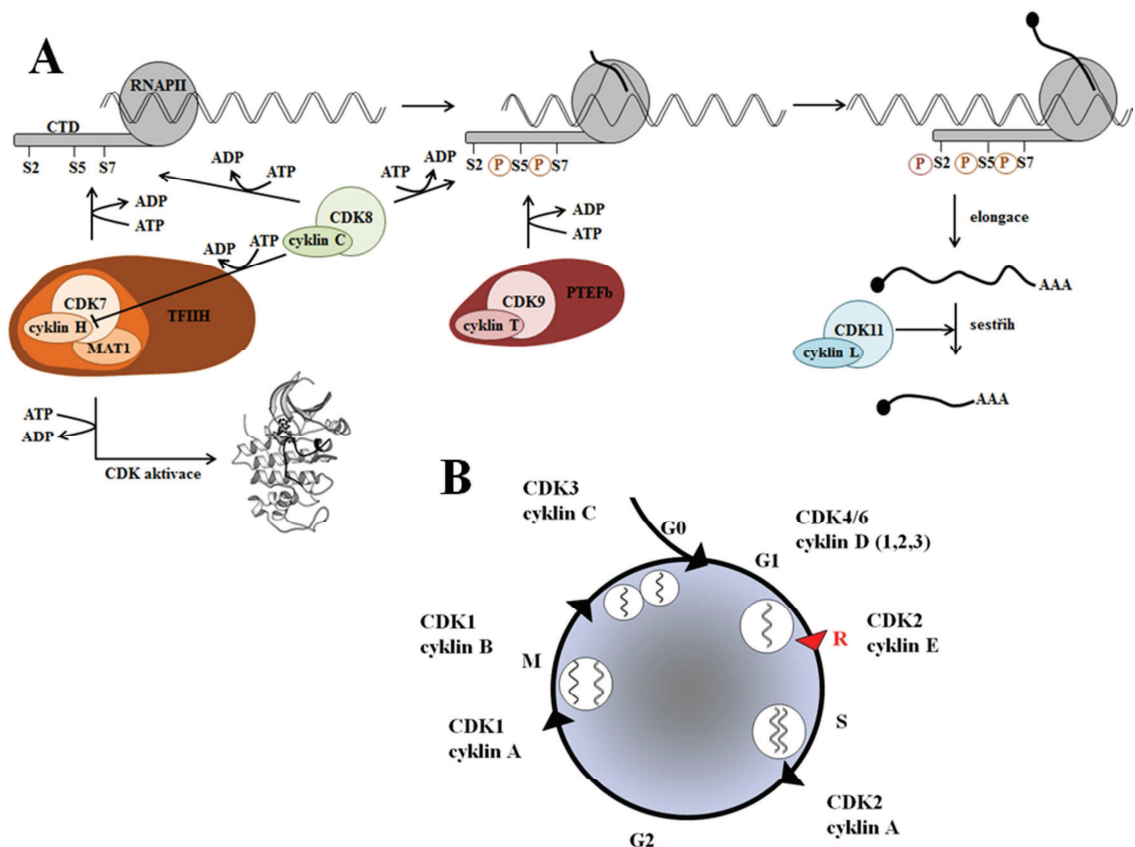
## 2.2. Regulace transkripce

Kromě regulace buněčného dělení kontrolují CDK též transkripční proces, a to prostřednictvím regulace enzymové aktivity RNAPII (RNA polymerase II), která jakožto jeho ústřední složka zajišťuje přepis DNA na mRNA a některé snRNA. Ze strukturního hlediska čítá RNAPII v základní podobě 12 podjednotek označovaných jako Rpb1-12 (DNA-directed RNA polymerase II subunits), z nichž největší Rpb1 hraje hlavní roli v kontrole RNAPII. Její součástí je tzv. CTD (C-terminal domain), jejíž aminokyselinové složení je poměrně unikátní.<sup>23</sup> Základním motivem je totiž heptapeptidová sekvence Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 opakující se v řadě za sebou. Množství repetice se pohybuje od 26, typických pro kvasinky, po 52 vyskytujících se u obratlovců.<sup>24</sup> V případě obratlovců je 21 opakování identických,

zatímco zbývající 31 obsahuje jednu nebo více substitucí v pozici 2, 4, 5 a 7.<sup>25-27</sup> Tyr1 a Pro6 se nachází ve všech repetitích, oproti Ser7, který byl identifikován jen u 26 opakování.<sup>24</sup> Výjimečnost této struktury ovšem spočívá především ve vysokém počtu potencionálních fosforylačních míst, jež jsou cílem několika typů CDK.

Na začátku transkripčního procesu dochází k fosforylaci Ser5 a Ser7 prostřednictvím CDK7 ve spojení s cyklinem H a MAT1 (ménage à trois), které jsou součástí TFIID (transcription factor IID).<sup>28-30</sup> Fosforylace Ser7 je klíčová pro navázání speciálního integračního komplexu na tělo RNAPII a transkripci snRNA.<sup>31</sup> Fosforylace Ser5 pak slouží jako dokovací místo pro vazbu enzymů modifikujících 5' konec vznikající mRNA 7-methylguanosem.<sup>32</sup> Po syntéze 20-40 nukleotidů dochází k zastavení transkripce pomocí proteinů DSIF (DRB sensitivity inducing factor, DRB = 5,6-dichloro-1-β-ribofuranosyl-benzimidazole), složeného z proteinů Spt4 a Spt5, a NELF (negative elongation factor).<sup>33</sup> Takto vzniklá prodleva umožňuje navázání elongačních faktorů a dalších proteinů modifikujících vznikající transkript na RNAPII.<sup>34</sup> Přechod do elongační fáze zajišťuje P-TEFb (positive transcriptional elongation factor b) a jeho složka CDK9 společně s cyklinem T fosforylující NELF společně s Spt5.<sup>28</sup> Na rozdíl od NELF, který disociuje z těla RNAPII, Spt5 zůstává nadále navázaný na transkripční mašinerii a přepíná se z negativního módu do role pozitivního regulátoru následné elongace.<sup>35,36</sup> CDK9 navíc fosforyluje též další rezidua v CTD, a to Ser2 a Thr4, což přispívá ke spuštění elongačního procesu.<sup>37</sup> Předčasnému ukončení transkripce v průběhu elongační fáze brání fosforylace Tyr1 prostřednictvím c-Abl (Abelson tyrosine kinase).<sup>38,39</sup> Zatímco fosfatasy SSU72, Rtr1 (RPAP2) a FCP1 postupně odstraňují fosfáty ze Ser5, do fosforylace Ser2 se zapojují komplexy CDK12/cyklin K a CDK13/cyklin K, jejichž aktivita je nejvyšší u 3' konce transkriptu.<sup>40-42</sup> CDK12/cyklin K jsou v transkripčním procesu důležité zejména pro expresi dlouhých genů s velkým počtem exonů, kam patří geny kódující regulátory genomové stability, včetně BRCA1 (breast cancer 1), ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), FANCD2 (Fanconi anemia complementation group 2) a FANCD1 (Fanconi anemia complementation group 1).<sup>43</sup> Po dokončení celého procesu fosfatasy odstraní všechny fosfáty, čímž je umožněna regenerace RNAPII a další kolo transkripčního cyklu.

Kromě zmíněných CDK jsou do regulace transkripce zapojeny další typy CDK. Cisek a Corden (1989) jako první ukázali, že CDK1 fosforyluje serinová rezidua v CTD.<sup>44</sup> Toto zjištění bylo později podpořeno studií, která ukázala, že CDK1/cyklin B



**Obrázek 1** Funkce CDK. **A** Zapojení CDK do transkripčního procesu. **B** Regulace buněčného cyklu pomocí CDK.

ve spolupráci s Pin1 (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1) hyperfosforyluje CTD v M fázi buněčného cyklu (isoforma se pak označuje jako RNAPIIOO), přičemž tato modifikace inhibuje aktivitu RNAPII, a přispívá tak k mitotickému umlčení genů.<sup>45</sup> Další kinasou s fosforylačním potenciálem vůči CTD je CDK8 (Rickert et al 1996).<sup>46</sup> Význam těchto modifikací nebyl ovšem doposud popsán. CDK8/cyklin C jakožto součást mediátoru negativně ovlivňuje progresi transkripčním cyklem, neboť fosforyluje cyklin H, což vede k jeho degradaci, a tím inaktivaci CDK7.<sup>47</sup> CDK11/cyklin L jsou pak zapojeny do sestříhu mRNA.<sup>48</sup>

### 2.3. Další funkce CDK

Ačkoli jsou CDK stimulovány již vazbou příslušných cyklinů, k jejich maximální aktivaci je nutná fosforylace v tzv. aktivační smyčce (též nazývána jako T-smyčka), kterou zprostředkovává CDK7 ve spojení s cyklinem H a interakčním partnerem MAT1 (komplex je nazýván jako CAK, CDK-activating kinase). Tento fakt byl potvrzen

dvěma nezávislými experimenty. V prvním byla inaktivována CDK7 u *Drosophila melanogaster*, což způsobilo pokles fosforylace T-smyčky CDK1, následně zablokování mitózy u zárodečné linie a také embryonální a larvální letalitu.<sup>49</sup> Teplotně podmíněná mutace v *cdk7* u *Caenorhabditis elegans* vedla k redukcii transkripce a umlčení CDK7 prostřednictvím RNA interference zastavení buněčného cyklu.<sup>50</sup> Strukturní podstata tohoto mechanismu bude popsána níže.

Ačkoli je CDK5 strukturně podobná ostatním členům CDK rodiny, její funkce jsou velmi specifické. Bylo prokázáno, že během embryogeneze je její aktivita nepostradatelná pro normální vývoj mozku.<sup>51</sup> U dospělých lidí pak reguluje přežívání neuronů, synaptickou plasticitu a je zapojena do procesů učení, drogové závislosti, signalizace bolesti aj.<sup>52-54</sup> Oproti ostatním CDK je aktivita CDK5 kontrolována odlišnými mechanismy, které zahrnují vazbu regulačních podjednotek p35 a p39 a autoinhibici prostřednictvím fosforylace p35 a její následné degradace.<sup>55-57</sup>

CDK16 (PCTK1) exprimovaná postmitotickými buňkami mozku reguluje společně s CDK5 cytoskeletální uspořádání během migrace neuronů a zároveň kontroluje růst neuritů.<sup>58</sup> Molekulární mechanismy těchto procesů nejsou ovšem doposud detailně prostudovány. Kromě cerebrální exprese byla detekována proteinová hladina též ve varlatech, kde hraje CDK16 ve spojení cyklinem Y esenciální roli ve spermatogenezi.<sup>59</sup> Spermatické buňky izolované z nadvarlat CDK16 deficientních myši totiž vykazovaly sníženou pohyblivost a navíc měly deformované hlavičky, což naznačuje, že je CDK16 důležitá při spermiaci. CDK16 má také promyogenní účinky, jelikož reguluje migraci a fúzi myoblastů.<sup>60</sup>

Mezi málo prozkoumané CDK patří CDK15 (ALS2CR7), u které byl pozorován onkogenní potenciál. Při sledování rezistence nádorových buněk k léčbě pomocí TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) bylo prokázáno, že CDK15 interaguje s proteinem survivinem a fosforyluje jej na Thr34.<sup>61</sup> Tato posttranslační modifikace následně stabilizuje survivin, a podporuje tak přežívání buňky.

## 2.4. Struktura CDK a regulace jejich aktivity

Poté co byly CDK popsány jako klíčové molekuly řídící nejrůznější buněčné pochody a jejich deregulace byla pozorována u mnoha nádorových onemocnění, začaly se mnohé vědecké skupiny věnovat studiu jejich proteinové struktury a regulace aktivity s cílem poskytnout bázi pro vývoj nízkomolekulárních inhibitorů. Jelikož byla nejintenzivněji

zkoumána struktura CDK2, bude následující text založen na poznacích týkajících se jejího uspořádání. Ostatní CDK patřící do stejné kinasové rodiny pak sdílí prakticky stejnou konformaci pouze s jemnými rozdíly.

CDK2 je tvořena 2 poddoménami, nazývanými též laloky, přičemž menší N-koncová část je bohatá na  $\beta$ -skládaný list a větší C-koncová poddoména je převážně helikální.<sup>62</sup> Obě části jsou propojeny polypeptidovým řetězcem, který slouží jako pant, kolem něhož mohou obě části rotovat. Součástí N-koncového laloku je jediný  $\alpha$ -helix (C-helix) obsahující sekvenci Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu, jež hraje důležitou roli při interakci CDK s cyklinem, a inhibiční segment bohatý na glycin nazývaný G-smyčka.<sup>63</sup> Její součástí jsou Thr14 a Tyr15, jejichž fosforylace blokuje aktivitu kinasy. Klíčovým elementem karboxyterminální poddomény je pak T-smyčka zapojující se též do regulace aktivity CDK. Katalytické místo, do něhož se váže ATP, je zasazeno hluboko uvnitř enzymu mezi oběma poddoménami a leží pod vysoce flexibilní G-smyčkou.

Správné načasování a souslednost aktivit jednotlivých CDK je zajištěno celou škálou regulačních mechanismů. Většina členů CDK rodiny je závislá na vazbě již zmíněných cyklinů. Při studiu interakce CDK2 s cyklinem A bylo zjištěno, že během vazby dochází ke konformačním změnám v oblasti C-helixu a přemístění postranního řetězce Glu51 do aktivního místa, kde vytváří solný můstek s Lys33, který kotví  $\alpha$  a  $\beta$  fosfátové skupiny ATP.<sup>62</sup> Ve volné formě je karboxyl Glu51 vystaven na povrchu molekuly, zatímco Glu33 vytváří solný můstek s další důležitou aminokyselinou Asp145, která v komplexu váže  $Mg^{2+}$ . K dalším strukturním reorganizacím dochází v místě aktivační smyčky. U volné CDK2 formují rezidua Gly147-Gly153  $\alpha$ L12 helix zasahující do katalytického místa, a znemožňující tak kontakt ATP se substrátem. U CDK2/cyklin A se mění jeho konformace na  $\beta$ -skládaný list, což vede k vychýlení T-smyčky z původní pozice, zpřístupnění aktivního místa a odkrytí Thr160, jehož fosforylace prostřednictvím CAK ústí v plnou aktivaci kinasy.

I když většina CDK podléhá stejnému dvoustupňovému procesu aktivace, existuje zde výjimka, a tou je CDK5. Její funkci totiž řídí proteiny p35 a p39, které nevykazují sekvenční podobnost s žádným typem cyklinu a neinteragují ani s dalšími CDK.<sup>64</sup> Rozdíl mezi oběma proteiny tkví v místně specifické expresi, kdy p35 je exprimována v cerebrálním kortexu vyvíjejícího se mozku, zatímco p39 je typická pro zadní mozek embryí i dospělých lidí a také postnatální cerebrální kortex.<sup>65-67</sup> Jedinečnost CDK5 spočívá také v její schopnosti regulovat svou vlastní aktivitu

prostřednictvím fosforylace p35 na Ser8 a Thr138.<sup>68</sup> Fosforylace Ser8 zůstává konstantní během vývoje mozku, zatímco fosforylace Thr138 během něj postupně klesá, což je pravděpodobně dáno působením proteinfosfatasy 1 či proteinfosfatasy 2A. Buněčná lokalizace p35 je díky myristoylaci vázaná na membrány a bylo prokázáno, že fosforylace Ser8 je důležitá pro udržení proteinu v cytoplasmě.<sup>69</sup> Fosforylace Thr138 pak brání štěpení p35 kalpainem, tím vzniku neurotoxického produktu p25 a zároveň způsobuje zvýšenou degradaci p35 proteasomem.<sup>68,70</sup> Podobný způsob regulace byl pozorován u již dříve zmíněné CDK14, která je schopná kontrolovat vlastní aktivitu prostřednictvím fosforylace svého partnera cyklinu Y na Ser71 a Ser73.<sup>71</sup> Takto modifikované aminokyseliny vytváří fosfodegron podporující asociaci cyklinu Y s SCF komplexem (Skp, Cullin, F-box containing complex), který následně katalyzuje ubiquitylaci cyklinu Y a jeho degradaci proteasomem. Kromě p35 a p39 byla prokázána interakce CDK5 s cykliny E a D, které inhibují aktivitu CDK5, a cyklinem I, což vede k expresi antiapoptotických proteinů Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a Bcl-X<sub>L</sub> (B-cell lymphoma-extra large).<sup>72-74</sup>

Kromě aktivační CDK7 jsou známe též inhibiční kinasy Wee1 a Myt1, které fosforylací Thr14 a Tyr15 v CDK2 blokují její aktivitu, a tím chrání buňku před předčasnou mitosou.<sup>75,76</sup> Kinetické a krystalografické analýzy prokázaly, že posttranslační modifikace Thr14 a Tyr15 stéricky brání vazbě proteinového substrátu.<sup>77</sup> Po fosforylaci Tyr15 v CDK2 sice nedochází ke změně  $K_M$  pro ATP, ovšem následná modifikace Thr14 znemožňuje vytvoření vhodné konfigurace ATP pro další fosforylaci substrátu. Princip inhibičních fosforylací je zachován prakticky u všech členů CDK rodiny, s výjimkou CDK5, u které fosforylace ekvivalentního Tyr15 prostřednictvím c-Abl ústí v její aktivaci.<sup>78</sup> K průchodu buněčným cyklem je nutné inhibiční fosfáty odstranit, přičemž tuto funkci plní rodina cdc25 fosfatas (a,b,c).<sup>79</sup> P-Thr14 i P-Tyr15 zůstávají po celou dobu vystaveny na povrchu proteinu, a jsou tudíž neustále přístupné Wee1/Myt1 i cdc25 fosfatasám.<sup>77</sup>

V určitých situacích, kdy například buňka nemá dostatek mitogenních signálů, podléhá diferenciaci či senescenci, je aktivita CDK blokována pomocí přirozených CDK inhibitorů. Proteiny INK4 rodiny (p15, p16, p18 a p19) se mohou vázat jak na monomerní CDK4/CDK6, čímž brání jejich interakci s cykliny D, tak na CDK/cyklin, což vede k tvorbě inaktivního komplexu.<sup>80-83</sup> Podle krystalové struktury CDK6/cyklin D (virový)/p18 je zřejmé, že p18 vychyluje katalytická rezidua z jejich původní pozice a deformuje ATP i cyklin vazebná místa.<sup>84</sup> Stejný princip blokování



CDK funguje i u ostatních INK4 inhibitorů. p21, p27 a p57, které jsou součástí Cip/Kip rodiny, pak potlačují aktivitu CDK vazbou na CDK/cyklin komplex.<sup>85,86</sup> Krystalová struktura ternárního komplexu CDK2/cyklin A/ p27 ukázala, že p27 interaguje s oběma proteiny, přičemž reorganizuje N-koncový lalok CDK2, a navíc zasahuje do katalytického místa, kde mimikuje ATP.<sup>87</sup> U ostatních členů Cip/Kip je opět předpokládán podobný mechanismus inhibice CDK.

## 2.5. Deregulace CDK

Ačkoli se může zdát, že faktory ovlivňující aktivitu CDK jsou natolik abundantní a spletité, že dokonale kontrolují správné načasování funkcí CDK, stávají se právě tyto vlastnosti nevýhodné z důvodu možnosti vzniku četných poškození, které vedou často ke vzniku nejrůznějších onemocnění včetně nádorových. Nejhojněji dochází ke zvyšování exprese cyklinů. Příkladem může být elevace cyklinu D u nemalobuněčného karcinomu plic, rakoviny prsu, slinivky břišní nebo jícnu.<sup>95-98</sup> Poměrně unikátním způsobem maligní transformace je proteolytické štěpení cyklinu E za vzniku jeho zkrácené formy, která vykazuje výrazně vyšší CDK aktivační schopnost.<sup>88</sup> U některých typů nádorů byly prokázány mutace (delece, umlčení, bodové mutace) genů kódujících přirozené inhibitory CDK. V jistých případech může být hyperaktivita způsobena i zvýšenou expresí samotného genu kódujícího danou CDK. Byly ovšem identifikovány i případy, kdy bodové mutace v CDK brání vazbě přirozených inhibitorů CDK. U melanomu byla detekována Arg24Cys substituce CDK4 způsobující sníženou citlivost k inhibici prostřednictvím p16 a zároveň ponechávající interakční potenciál s cyklinem D.<sup>136</sup> V neposlední řadě pak může dojít i ke zvýšené expresi cdc25 fosfatasy. Jak již bylo naznačeno výše, některé CDK vykazují nádorově supresorové vlastnosti, a není tedy překvapením, že jejich snížená produkce či mutace potlačující kinasovou funkci způsobuje tumorigenezi. K takovým kinasám se řadí CDK12, jejíž mutace znemožňují interakci s cyklinem K, což vede k poklesu hladin proteinů zapojených do opravy DNA dvouřetězcových zlomů, prohlubování genomové nestability a vzniku nádorů vaječníků.<sup>137</sup>

Ať už je příčina hyperaktivace CDK jakákoli, důsledky jsou si velmi podobné. Trvale aktivní CDK totiž nadměrně fosforylují své substráty, a umožňují tak buňkám projít buněčným cyklem navzdory nepříznivým intra- či extracelulárním podmínkám, a to i v případech, kdy je poškozena DNA. Strategie jak potlačit hyperaktivaci CDK

**Tabulka 1** Aberace CDK a jejich regulátorů vedoucí ke vzniku nádorových onemocnění

	cyklin A	AML, rakovina prsu, ledvin, štítné žlázy	89-92
	cyklin B	rakovina kolorekta, prsu	93,94
	cyklin D	nemalobuněčný karcinom plic, rakovina prsu, slinivky břišní, jícnu	95-98
	cyklin E	osteosarkom, rakovina vaječnicků, žaludku	99-101
	CDK1	difúzní velkobuněčný B-lymfom,	102
	CDK2	rakovina vaječnicků, prsu, hrtanu	103,104
	CDK3	glioblastom, rakovina prsu	105,106
<b>zvýšená exprese</b>	CDK4	melanom, glioblastom, osteosarkom, rakovina plic	107-110
	CDK5	rakovina prostaty, slinivky břišní, prsu	111-113
	CDK6	T-buněčný lymfom, meduloblastom, rakovina močového měchýře	114-116
	CDK8	rakovina kolorekta	117
	CDK11	osteosarkom, rakovina prsu	118,119
	CDK13	hepatocelulární karcinom	120
	CDK14	hepatocelulární karcinom, rakovina jícnu	121,122
	CDK18	rakovina jícnu	122
	cdc25	rakovina prsu, vulvální, hepatocelulární karcinom	123-125
		CDK7	rakovina jícnu
	CDK10	rakovina prsu, žlučníku	126,127
	CDK19	lymfom, leukémie	128
<b>snížená exprese</b>	p15 <sup>INK4</sup>	rakovina močového měchýře	129
	p16 <sup>INK4</sup>	rakovina prsu, hrdla a hltanu	130,131
	p21 <sup>Cip1/Waf1</sup>	rakovina hrtanu	132
	p27 <sup>Cip1/Waf1</sup>	rakovina prostaty, úst	133,134
<b>mutace</b>	CDK2	glioblastom (P45K)	135
	CDK4	melanom (R24C)	136
	CDK12	rakovina vaječnicků	137

u nádorových onemocnění jsou v principu dvě. Jednak lze nepřímo manipulovat regulačními drahami, které ovlivňují aktivitu CDK, nebo přímo zablokovat funkce CDK prostřednictvím nízkomolekulárních inhibitorů. V prvním případě se může jednat o změnu exprese a syntézy cyklínů, přirozených inhibitorů CDK či modulaci fosforylačního stavu CDK ovlivněním proteinkinas nebo fosfatas odpovědných za tyto posttranslační modifikace, ale také o regulaci proteolytického aparátu, který degraduje cyklíny nebo regulátory CDK. V posledních letech ovšem došlo k výraznému pokroku ve vývoji nízkomolekulárních inhibitorů a jejich potenciál v léčbě mnoha onemocnění

bude popsán níže, stejně jako strategie k zacílení malignit vyznačujících se deregulací nádorově supresorových CDK.

## 2.6. Inhibice CDK

Studium molekulárních mechanismů maligní transformace a popsání deregulace CDK během tohoto procesu vzbudilo zájem mnoha vědeckých skupin o vývoj sloučenin, které by zablokovaly aktivitu CDK. Během 90. let 20. století byly objeveny první nízkomolekulární CDK inhibitory s terapeutickým potenciálem vůči řadě chorob, což následně vedlo k intenzivnějšímu výzkumu a syntéze ještě účinnějších látek, z nichž je v současnosti několik v různých fázích klinických testů (**Tabulka 2, Obrázek 2**).<sup>138-140</sup>

### 2.6.1. Počátky vývoje CDK inhibitorů

Původ prvních nízkomolekulárních CDK inhibitorů je převážně přírodní, jelikož valná většina aktivních substancí byla izolována z bakterií, hub či rostlin. Mechanismus protinádorových účinků objevených sloučenin, jenž byl zprvu neznámý, pomohly odhalit následné biochemické studie, které ukázaly, že se jedná o látky kompetující s ATP o aktivní místo CDK. Ze strukturního hlediska jde pak často o planární polycyklické heteroaromatické molekuly.

Staurosporin (AM-2282), bisindolový alkaloid izolovaný v roce 1977 ze *Streptomyces staurosporeus*, byl původně používán jako antimykotikum, přičemž jeho účinky byly přisuzovány inhibici PKC (protein kinase C) ( $IC_{50}$  2,7 nM).<sup>141,142</sup> Později bylo zjištěno, že se jedná o širokospektrý kinasový inhibitor blokující při vyšších koncentracích (160 nM) normální i transformované buňky v G2 fázi.<sup>143,144</sup> Kinasou odpovědnou za tento efekt byla poté identifikována CDK1, kterou staurosporin inhiboval s  $IC_{50}$  4-5 nM.<sup>144</sup> Právě nedostatek specifity jej však vyřadil z kandidátů pro klinické testování.

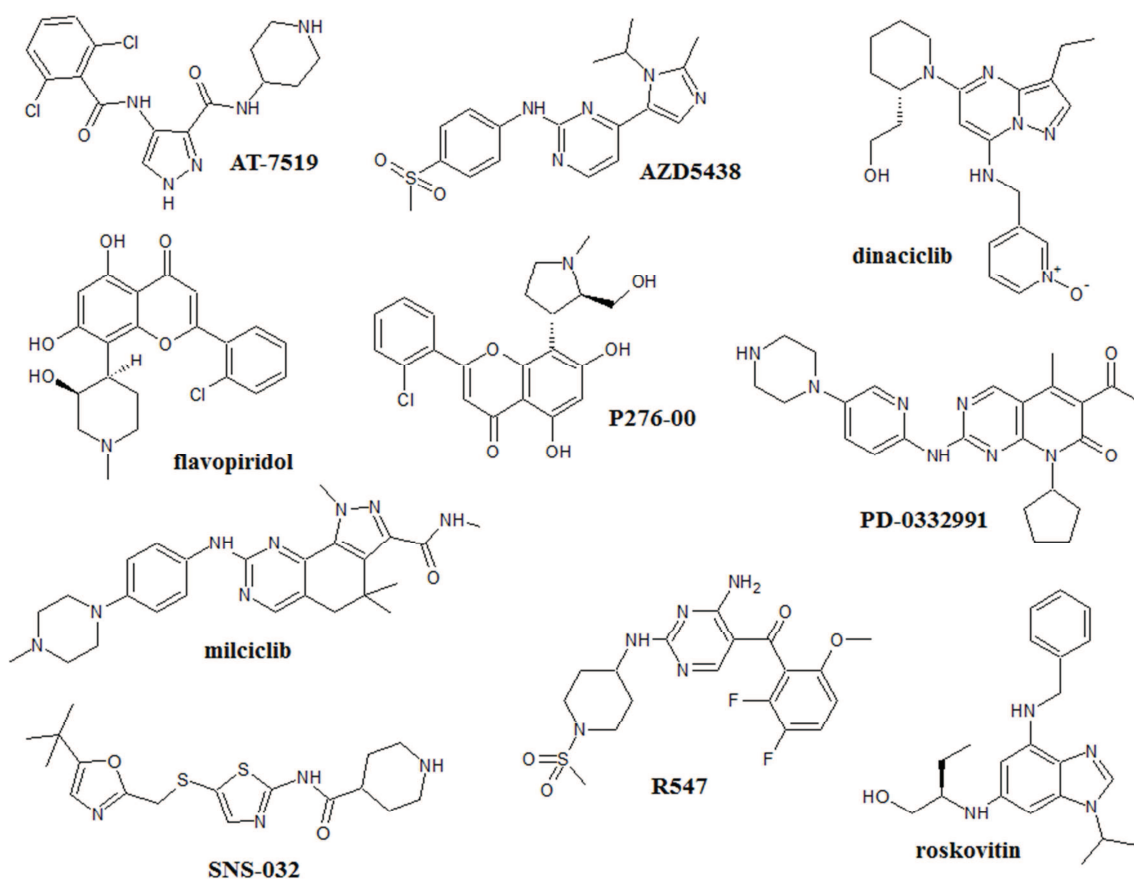
Během screeningu CDK1 inhibitorů v médiu s bakteriální kulturou *Aspergillus terreus* byl objeven metabolit butyrolakton I, který kromě CDK1 blokoval též CDK2.<sup>145</sup> Oproti staurosporinu byl ovšem výrazně specifitější. Testováním na buněčných liniích odvozených od malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic se potvrdily předchozí zjištění, jelikož butyrolakton I blokoval buňky v G2/M fázi.<sup>146</sup>

**Tabulka 2** Vybrané klinicky testované CDK inhibitory (zdroj *www.clinicaltrials.gov*).

název	CDK preference	fáze testů	Onemocnění
AT-7519	1,2,4,6,9	I/II	pokročilé metastazující solidní tumory, non-Hodgkinův lymfom, mnohočetný myelom, lymfom plášťových buněk, chronická myeloidní leukémie
AZD5438	1,2,9	I	pokročilé solidní malignity
dinaciclil / SCH-727965	1,2,5,9	I/II	solidní tumory, mnohočetný myelom, non-Hodgkinův lymfom, melanom, rakovina prsu, NSCLC
flavopiridol / alvocidil	1,2,4,6,7,9	I/II	Hematologické malignity
P276-00	1,4,9	I/II	mnohočetný myelom, melanom, rakovina hlavy a krku
PD-0332991	4,6	I/II	lymfom plášťových buněk, pokročilý hepatocelulární karcinom, glioblastom
milciclil / PHA-848125	1,2,4	I/II	solidní tumory, rakovina brzlíku
R547	1,2,4	I	pokročilé solidní tumory
roskovitin / seliciclil / CYC-202	2,5,7,9	II	Cushingův syndrom
SNS-032	2,7,9	I	pokročilé solidní tumory, pokročilé B-lymfoidní malignity

U pankreatických nádorových linií indukoval expresi proteinu Bax (Bcl-2-associated X protein), což následně vedlo k apoptose.<sup>147</sup> Jeho protinádorové účinky jsou však značně omezeny nízkou permeabilitou přes cytoplasmatickou membránu.<sup>146</sup>

Během studia bentických organismů žijících v oblasti McMurdo Sound v Antarktidě byly identifikovány houby, které byly toxické pro okolní ryby.<sup>148</sup> Později se ukázalo, že extrakt jedné z nich (*Kirkpatrickia variolosa*) vykazuje antileukemické účinky a následně byly vyizolovány jeho bioaktivní složky, jimž byl dán název varioliny.<sup>149</sup> Nejúčinnější molekulou byl stanoven variolin B, přičemž krystalografická analýza odhalila, že se jedná o pyridopyrrolopyrimidin, který má navíc i antivirální efekt. U několika nádorových linií byl prokázán blok buněčného cyklu v G1 i G2 fázích, za nějž je zodpovědná inhibice CDK1 a CDK2.<sup>150</sup> Strukturně blízkými



**Obrázek 2** Chemické struktury vybraných klinicky testovaných CDK inhibitorů.

sloučeninami jsou meridianiny, indolové alkaloidy izolované z jihoatlantické sumky *Aplidium meridianum*, které rovněž vykázaly protinádorovou aktivitu spojenou s inhibicí CDK.<sup>151</sup> Varioliny a meridianiny pak daly základ nové čisté chemické třídě látek, tzv. meriolinům.<sup>152</sup> Oproti variolinu B i meridianinům vykázaly merioliny zvýšenou specifitu a účinnost vůči CDK a zároveň antiproliferační vlastnosti. U neuroblastomové linie byl pak objasněn mechanismus účinku meriolinu 3, kdy došlo k rapidnímu poklesu hladiny proteinu Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), uvolnění cytochromu *c* do cytoplasmy a aktivaci kaspas.

Tradiční čínská medicína se stala předmětem zájmu několika vědeckých skupin, přičemž jedné z nich se podařilo identifikovat aktivní ingredienci Danggui Longhui Wan, což je směs bylin používaná při léčbě chronických onemocnění. Je jí indirubin, 3,2-bisindol, který je účinným inhibitorem CDK a potlačuje proliferaci buněk prostřednictvím G2/M bloku.<sup>153</sup> Podobnou, avšak uměle vytvořenou sloučeninou, je SU9516, jenž je selektivním inhibitorem CDK2.<sup>154</sup> U několika nádorových linií blokoval fosforylaci pRb, indukoval G1 a G2/M blok a způsobil aktivaci kaspasy 3.

Krystalografická analýza odhalila jeho vazbu na Leu83 CDK2, což je klíčová interakce společná pro všechny účinné ATP-kompetitivní inhibitory.<sup>155</sup> Zda byl SU9516 inspirován strukturou indirubinu lze pouze spekulovat, i když podoba je více než zřetelná.

Během screeningu aromatických cytokininů vůči inhibici CDK1 byl identifikován purin, jenž kromě CDK1, kterou blokoval nejúčinněji ze všech testovaných sloučenin ( $IC_{50}$  7  $\mu$ M), inhiboval rovněž CDK2 a CDK5 ( $IC_{50}$  7; 3  $\mu$ M).<sup>156</sup> Tato látka byla pojmenována podle města svého původu jako olomoucín a stala se mateřskou sloučeninou pro následně vyvinuté inhibitory. Strukturální modifikací byl například získán 2,6,9-trisubstituovaný purin roskovitin (CYC-202, seliciclib), jehož CDK inhibiční účinky daleko předčily efekty samotného olomoucínu.<sup>157</sup> Ačkoli roskovitin vykazoval podobnou selektivitu pro CDK jako olomoucín, blokoval aktivitu CDK1, CDK2 a CDK5 při 10x nižších koncentracích ( $IC_{50}$  0,65; 0,7 a 0,2  $\mu$ M). Vůči CDK4 a CDK6 byl pak prakticky neúčinný ( $IC_{50}$  > 100  $\mu$ M). Na základě výsledků z preklinických studií byl roskovitin podroben klinickému testování proti nemalobuněčnému karcinomu plic a karcinomu nosohltanu, ve kterém ovšem selhal ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), identifier NCT00372073). Jednou z možných příčin může být jeho rychlá *in vivo* přeměna na metabolit s oxidovanou hydroxyskupinou na C2 postranním řetězci, čímž je potlačena CDK inhibiční účinnost, a tím i terapeutický efekt.<sup>158</sup>

Strukturálně odlišným CDK inhibitorem je flavopiridol (alvocidib), semisyntetický derivát alkaloidu izolovaného z indické rostliny *Dysoxylum binectariferum*. V prvních preklinických studiích bylo zjištěno, že způsobuje zablokování buněčného cyklu u linií odvozených od nádorů prsu a plic, což bylo následně odůvodněno schopností flavopiridolu inhibovat CDK1, CDK2 a CDK4.<sup>159-161</sup> V dalších studiích se ukázalo, že je flavopiridol schopný potlačit růst lidských nádorových xenograftů a navíc zesiluje účinky radiace i klasických chemoterapeutik.<sup>162-167</sup> Ačkoli jeho uvedení do klinických testů proběhlo úspěšně, v dalších fázích se ukázalo, že jako monoterapeutikum nevykazuje aktivitu, je toxický v závislosti na množství a není účinný ani v kombinaci s jinými používanými léčivy.<sup>168-174</sup>

Zpočátku byly protinádorové účinky zmíněných CDK inhibitorů přičítány schopnosti daných molekul blokovat CDK regulující buněčný cyklus, ovšem později se ukázalo, že za jejich biologickými účinky stojí též inhibice transkripčních CDK. Látky, které vykazují takové vlastnosti, se pak označují jako panselektivní. Terapie

založené na principu inhibice transkripce mohou být výhodné především u onemocnění, která jsou závislá na expresi onkogenů s krátkým poločasem rozpadu. Jedná se často o antiapoptotické proteiny Bcl-2, Mcl-1, cIAP-1 (cellular inhibitor of apoptosis 1), survivin či XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Kupříkladu flavopiridol, který je účinným inhibitorem CDK7 a CDK9 ( $IC_{50}$  110-300 nM resp.  $K_i$  3 nM), potlačil fosforylaci Ser2 a Ser5 CTD RNAPII u buněk chronické lymfoidní leukémie, což vedlo k poklesu Mcl-1 a XIAP, a tím k indukci apoptozy.<sup>161,175,176</sup> U roskovitinu byla také prokázána CDK7 a CDK9 inhibiční účinnost (0,6; 0,6  $\mu$ M) a několik preklinických studií potvrdilo stejný mechanismus účinku jako u flavopiridolu.<sup>177</sup> U mnohočetného myelomu zabránil fosforylaci Ser2 a Ser5 CTD RNAPII vedoucí k poklesu Mcl-1 a iniciaci apoptozy.<sup>178-180</sup> U chronické lymfoidní leukémie dokonce způsobil downregulaci TFIIB, TFIID, TFIIE $\beta$  a eukaryotních iniciačních faktorů eIF-2 $\alpha$ ,  $\gamma$  a eIF-4.<sup>181</sup>

Inhibice transkripce se kromě předchozích důsledků odráží i na stabilizaci a aktivaci nádorového supresoru p53, který jakožto transkripční faktor reguluje odpověď buňky na různé typy stresu. Za normálních podmínek protein Mdm2 (mouse double minute 2) ubiquitinyluje p53, a to vede k jeho následné degradaci proteasomem. Při použití flavopiridolu či roskovitinu však klesá hladina Mdm2, přičemž dochází k p53 indukované expresi p21 a proapoptotických proteinů Bax a Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis).<sup>182,183</sup> Při použití transkripčních inhibitorů lze navíc dosáhnout potlačení angiogeneze sníženou produkcí VEGF (vascular endothelial growth factor), jehož syntéza je rovněž blokována v důsledku CDK9 inhibice.<sup>184</sup>

Počáteční úspěch zmíněných CDK inhibitorů inspiroval mnoho vědeckých skupin k syntéze podobných látek, které by překonaly protinádorové účinky mateřských sloučenin. Selhání flavopiridolu a roskovitinu v klinických testech se pak stává výzvou k vytvoření molekul, u kterých by došlo ke zlepšení farmakokinetických vlastností, a navíc je čím dál zřejmější, že pro terapii nádorů pomocí CDK inhibitorů bude nutné znát přesné genetické pozadí daného onemocnění.

### **2.6.2. CDK inhibitory druhé generace**

I když první CDK inhibitory vykazovaly v preklinických studiích slibné protinádorové vlastnosti, jejich nespecifita naznačovala, že by mohly mít při případných terapiích závažné vedlejší účinky. Často se navíc jedná o sloučeniny, které nejsou metabolicky

stabilní a navíc mají nízkou biodostupnost. Přesto všechno byl díky nim položen základ pro vývoj ještě účinnějších sloučenin, jež tvoří většinu současně klinicky testovaných CDK inhibitorů.

### 2.6.2.1. Roskovitin a jeho analoga

Selektivita, inhibiční potenciál a biologické účinky roskovitinu stály za rozsáhlým výzkumem, jehož cílem bylo a stále je vytvořit silnější inhibitory. Cílem modifikací se staly jednak substituce v 2,6 a 9 pozicích a dále množství i poloha dusíkových atomů samotného purinového skeletu.<sup>185</sup> Kombinací obou přístupů je pak vytvořeno široké pole pro design velkého množství sloučenin.

Pomocí první strategie byl vytvořen například purinový derivát roskovitinu olomoucín II, který je selektivní vůči CDK2, CDK7 a CDK9.<sup>186</sup> Olomoucín II byl testován na panelu nádorových linií, přičemž efektivně blokoval jejich proliferaci s preferencí pro buňky exprimující wild-type p53. Hlavním mechanismem účinku této látky se jeví inhibice transkripce. Purin CVT313 blokoval aktivitu CDK2 s  $IC_{50}$  0,5  $\mu$ M, to se v buněčném systému projevilo potlačením fosforylace pRb a zablokováním buněčného cyklu v G1/S.<sup>187</sup> Dalším roskovitinovým analogem je látka CR8.<sup>188</sup> Mezi 108 testovanými kinasami byla stanovena její preference pro CDK1, CDK2, CDK3, CDK5, CDK7 a CDK9, které inhibovala 2-4x silněji než samotný roskovitin. U 25 buněčných linií byla po ovlivnění CR8 sledována mnohonásobně vyšší indukce apoptosy než při použití roskovitinu.

Druhým přístupem lze získat tzv. bioisostery, přičemž již byla nasyntetizována řada takových sloučenin.<sup>185</sup> U některých byly zachovány vlastnosti purinu, některé ale zase ztratily CDK inhibiční potenciál. Zároveň byly vyvinuty molekuly, u nichž došlo k nárůstu CDK inhibiční aktivity. Jedná se o pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny, pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny a pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny.<sup>189-191</sup> Obměnou substituentů pak byl dán vznik mnoha látkám, z nichž se již jedna dostala do klinického testování.

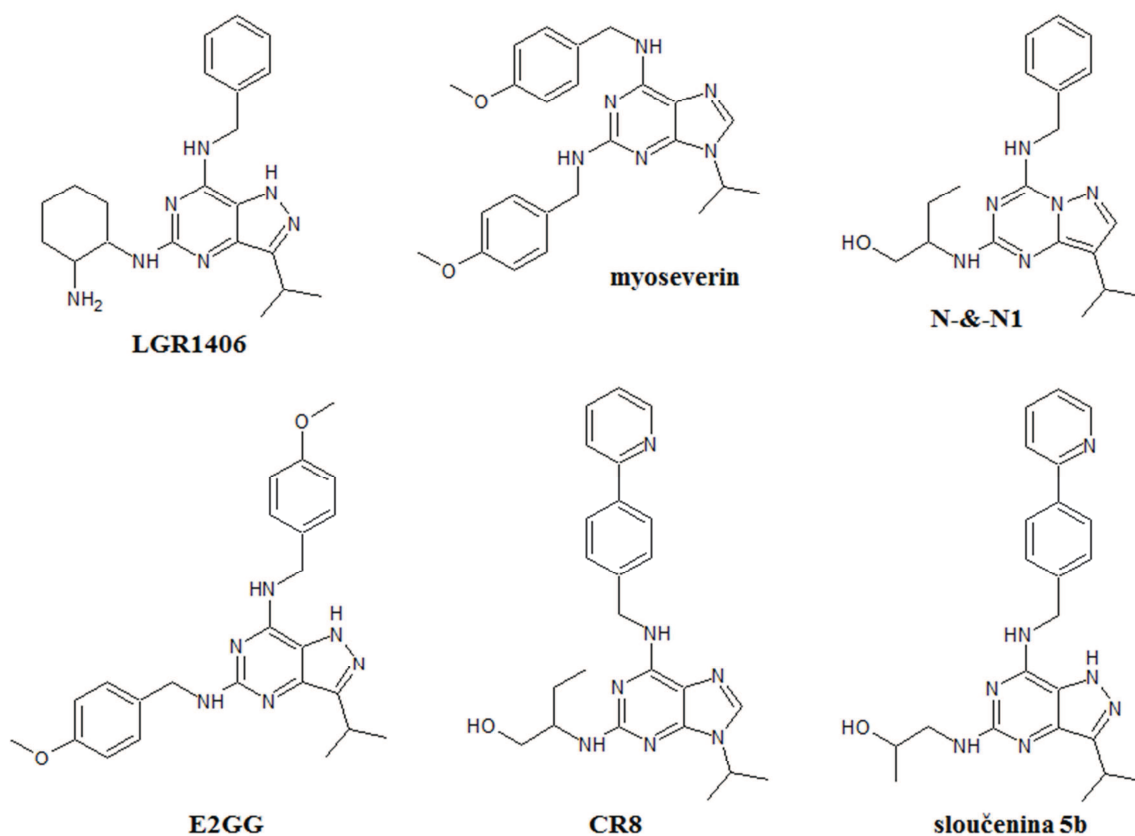
3,7-disubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny se ukázaly jako silné inhibitory CDK1 s protinádorovým potenciálem vůči leukemické linii K562.<sup>189</sup> Další substituce v poloze 5 poskytla sloučeninu LGR1406, která byla schopná potlačit proliferaci buněk hladkého svalstva prostřednictvím bloku buněčného cyklu v G1, a to přibližně 5x účinněji než roskovitin.<sup>192</sup> LGR1406 by tak mohla být využita u pacientů trpících restenózou, což je jev charakterizovaný znovuzúžením tepny, například



po angioplastice. Dalším testovaným pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinem je látka E2GG, která je bioisosterem mikrotubulárního inhibitoru myoseverinu.<sup>193</sup> Oproti myoseverinu sice E2GG ztrácí schopnost blokovat tvorbu mikrotubulů, vykazuje ovšem inhibiční účinky vůči CDK1, CDK2 a CDK7. Biologické účinky výše zmíněného purinu CR8 nás motivovaly k syntéze látek se zlepšenými protinádorovými vlastnostmi. Podařilo se nám vytvořit a charakterizovat řadu jeho pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových analogů, které se liší v substituentu v poloze 5.<sup>194</sup> Nejúčinnější derivát byl asi 7x silnějším CDK2 inhibitorem než CR8. U linie HCT116 indukoval G1 a G2/M blok s následnou aktivací apoptosy. Vzhledem k podobnosti ATP-vazebného místa CDK2 s CDK5 nebylo překvapením, že blokoval i její aktivitu, což bylo spojené s poklesem fosforylace FAK (focal adhesion kinase), substrátu CDK5. Ačkoli se zatím jedná pouze o spekulaci, je možné, že CDK5 inhibitory mohou právě díky inhibici FAK potlačit metastatický potenciál nádorů.

Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinové jádro se rovněž ukázalo jako vhodný základ pro design účinných CDK inhibitorů.<sup>190</sup> Bromovaný derivát s tímto skeletem se projevil jako silný a zároveň selektivní inhibitor CDK2, který je navíc i orálně dostupný. Vhodnou kombinací postranních substituentů byla získána sloučenina SCH 727965, známá spíše jako dinaciclib.<sup>195</sup> Dinaciclib blokoval CDK2, CDK5, CDK1 a CDK9 již v nanomolárních koncentracích (IC<sub>50</sub> 1, 1, 3 a 4 nM), indukoval apoptosu v mnoha nádorových liniích a způsobil regresi nádorů v řadě myších modelů. V současné době je klinicky testován vůči melanomu, nádorům prsu a plic a několika hematologickým onemocněním, včetně mnohočetného myelomu a chronické lymfoidní leukemie ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), identifiers NCT01026324 NCT00871663). Dalším pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinem s unikátními vlastnostmi je látka BS-181, jejíž účinky budou popsány níže.

Pyrazolo[1,5-*a*]pyridin N-&-N1 byl testován vůči inhibici CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9, které blokoval ve srovnání s roskovitinem 3-5x silněji.<sup>191</sup> Následně byly sledovány účinky N-&-N1 na panelu 60 nádorových linií, kde bioisoster roskovitinu inhiboval proliferaci v průměru 14x efektivněji než samotný roskovitin. Obzvláště pak melanomové linie byly velmi senzitivní k indukci buněčné smrti, což může být dáno jejich závislostí na aktivitě CDK2.<sup>196</sup> Protinádorové vlastnosti N-&-N1 byly zkoumány též na myším xenograftu Ewingova sarkomu, u něhož 2x nižší koncentrace N-&-N1 vyvolala stejné účinky jako roskovitin.



**Obrázek 3** Chemické struktury některých preklinicky testovaných CDK inhibitorů.

Předchozí poznatky byly komplexně studovány z hlediska biologické aktivity jednotlivých molekul a zároveň jejím vztahem ke struktuře daných látek. Spojením dat s výsledky z krystalografických studií pak byly získány cenné poznatky, které mohou posloužit při vývoji nových sloučenin. Při zkoumání vazebného módu purinů do aktivního místa CDK2 se ukázalo, že velkou roli při interakci hraje pětičlenný kruh, který je v přímém kontaktu s pantovou oblastí kinasy.<sup>197</sup> Pro účinnou inhibici je dále nezbytná přítomnost atomu dusíku v poloze 7, jelikož vytváří vodíkovou vazbu s aminoskupinou Leu83. Zavedením atomu dusíku do pozice 5 pak dochází ke zvýšení bazicity skeletu, což má za následek zesílení vodíkové vazby s Leu83 a zvýšení afinity k CDK.<sup>191</sup> Naopak rozložení i počet atomů dusíku v šestičlenném kruhu není tolik zásadní.

### 2.6.2.2. Od panelektivních inhibitorů ke specifickým sloučeninám

Kromě vývoje nových panelektivních inhibitorů se zájem medicínálních chemiků upírá též směrem k syntéze látek, které specificky zablokují funkce pouze jedné kinasy.

Vzhledem k příbuznosti CDK, a tudíž velké podobnosti jejich aktivních center, je poněkud obtížné takové molekuly navrhnout a syntetizovat.<sup>198</sup> To je pravděpodobně také důvodem, proč bylo doposud vytvořeno jen několik monospecifických inhibitorů. Na základě znalostí interakce CDK se známými inhibitory a rovněž díky molekulárnímu modelování je však možné zachytit jemné rozdíly ve vazebných místech jednotlivých CDK a vyvíjet selektivní sloučeniny.

Příkladem monospecifického inhibitoru může být již dříve zmíněná látka BS-181, což je vysoce specifický CDK7 inhibitor, jehož pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinové jádro bylo odvozeno od roskovitinu.<sup>199</sup> Biologická data ukazují, že BS-181 způsobuje zablokování buněčného cyklu, apoptosu nádorových linií a vykazuje i protinádorové účinky *in vivo*. Další selektivní sloučeninou je EXEL-8647, který blokuje aktivitu CDK9, a to 100x účinněji než CDK1, CDK2, CDK4 a CDK7.<sup>200</sup> Při jeho použití dochází k zastavení proliferace a indukci apoptosy nádorových buněk jak *in vitro*, tak *in vivo*. Za zmínku pak stojí také látka LDC000067 selektivně inhibující CDK9 (IC<sub>50</sub> 44 nM), jež podle předpokladu potlačila fosforylaci Ser2 CDK9 s následnou stabilizací a aktivací p53.<sup>201</sup>

## 2.7. Charakterizace funkcí CDK pomocí genetických modelů

Většina doposud vytvořených inhibitorů vykazuje již dříve zmíněnou panelektivitu, která může stát za vznikem vedlejších účinků při jejich případném použití v klinickém testování. Na základě genetických studií navíc začíná být čím dál zřejmější, že bude výhodnější vyvíjet sloučeniny specifické vůči jedné kinase. Co by v této strategii mohlo ztížit situaci, je vzájemná kompenzovatelnost některých typů CDK, která se dá vyřešit kombinací monospecifických inhibitorů.

Bylo prokázáno, že při umlčení CDK2, CDK4 či CDK6 u myši není postižena jejich životaschopnost, což je pravděpodobně dáno právě schopností jejich vzájemné kompenzace. Pro některé typy buněk jsou však tyto genetické změny fatální.<sup>202-204</sup> Například delece CDK4 u myši způsobila vznik diabetu kvůli redukcii počtu  $\beta$ -buněk pankreatu, a u samic navíc i neplodnost.<sup>203</sup> Za sterilitou stojí potlačená tvorba laktotrofů hypofýzy produkujících prolaktin, což je hormon ovlivňující sekreci progesteronu, který zajišťuje implantaci vajíčka.<sup>205</sup> Delece CDK6 způsobuje pokles erytrocytů v periferní krvi, a navíc i snížení počtu krevních buněk v brzlíku a slezině.<sup>203</sup> Umlčení CDK2 vedlo podobně jako u CDK4 k neplodnosti, a to z důvodu nezbytnosti

CDK2 pro ukončení profáze I během meiosis.<sup>202</sup> V případě zablokování CDK2 při nádorové terapii může být tudíž ovlivněna plodnost, přičemž při jejím přerušení je pravděpodobné, že dojde k obnovení zrání pohlavních buněk. Stejně tak během aplikace CDK4 specifického inhibitoru by byla znemožněna případná gravidita, během níž dochází k proliferaci laktotrofů. K rozvoji diabetu by ovšem dojít nemělo, jelikož  $\beta$ -buňky vykazují dlouhou životnost.<sup>206</sup>

Kombinovaná umlčení CDK2, CDK4 a CDK6 pomohla zjistit, které kiny jsou schopné vzájemné kompenzace. Myší embryonální fibroblasty (MEF) se společně umlčenou CDK4 a CDK6 normálně proliferovaly, během sérové deprivace přešly do G0 fáze a po mitogenní stimulaci byly schopné znovu projít buněčným cyklem.<sup>204</sup> Vzhledem ke schopnosti interakce CDK2 s cykliny D a inhibici proliferace CDK4<sup>-/-</sup> CDK6<sup>-/-</sup> mutantních MEF po umlčení CDK2 pomocí shRNA ve srovnání s normálními MEF je zřejmé, že za kompenzací funkcí CDK4 a CDK6 stojí právě CDK2.<sup>207</sup> Během embryonálního vývoje ovšem vznikají u CDK4<sup>-/-</sup> CDK6<sup>-/-</sup> mutantních myší defekty v hematopoese, které vedou až k letalitě.<sup>204</sup> Během protinádorové terapie pomocí CDK4 a CDK6 specifických inhibitorů je tudíž nutné počítat s případným negativním ovlivněním krvetvorby. PD 0332991 jakožto první klinicky schválený CDK inhibitor je právě takovým inhibitorem a jeho použití je skutečně spojeno se vznikem neutropénie, trombocytopenie a anémie.<sup>208</sup> Relativní postradatelnost CDK2, kromě již zmíněné funkce při meiose, není způsobena jejím zastoupením CDK4 či CDK6, ale CDK1.<sup>209,210</sup>

U dalších CDK buď doposud nebyla prokázána kompenzovatelnost, nebo se o ní zatím jen spekuluje. Mitotická CDK1 je schopná zastoupit funkce CDK2, CDK3, CDK4 i CDK6, ovšem její samotné umlčení je pro buňky letální.<sup>211</sup> Myší CDK1<sup>-/-</sup> embrya pak odumírají ještě před vznikem moruly. Podobné důsledky mají i delece cyklinu A2 a B1, vazebných partnerů CDK1, které vedou též k rané embryonální letalitě.<sup>212,213</sup> Dále bylo prokázáno, že ablace CDK11 u myší indukovala mitotických blok a apoptosu buněk blastocysty.<sup>214</sup> Podobně vyřazení CDK7 způsobilo embryonální letalitu v důsledku poškození fosforylace T-smyček ostatních CDK, avšak bez dopadu na transkripci, což naznačuje, že funkce CDK7 jsou v transkripčním procesu kompenzovány jinými kinasami.<sup>215</sup> Mohou jimi být CDK1, CDK2 či kiny, u nichž byl výše popsán transkripční potenciál.<sup>216,217</sup> Ztráta exprese CDK7 u proliferujících tkání dospělců sice nepostihla jejich buněčnou obměnu, nicméně došlo k oslabení rezerv kmenových buněk, zkracování telomer, předčasnému stárnutí a smrti.<sup>215</sup> Výjimečnost CDK5 už sama o sobě naznačuje, že jsou její funkce nezastupitelné a její umlčení může

poškodit mozkovou aktivitu. Bylo totiž prokázáno, že je CDK5 esenciální pro neurogenezi hipokampu dospělých myší.<sup>218</sup> Kompletní vyřazení těchto kinas by na základě daných faktů mohlo mít poměrně vážné vedlejší účinky, se kterými je nutné počítat při případné protinádorové terapii.

Ačkoli by se na základě předchozích faktů mohlo zdát, že využití inhibitorů specifických vůči některým CDK v klinické praxi by mělo značný negativní dopad na zdraví pacienta, existuje nová strategie, pomocí níž by měly být potlačeny vedlejší účinky způsobené danými látkami. Koncept tohoto přístupu a jeho využití budou popsány níže.

### **3. Využití syntetické letality pro optimalizaci protinádorových terapií**

I když došlo během posledních let k výraznému pokroku v odhalování mechanismů molekulární transformace, v popředí protinádorových terapií se neustále drží klasická chemoterapie založená převážně na inhibici funkce mitotického vřeténka, blokování syntézy DNA či vyvolání DNA poškození. Jejím cílem je postižení nekontrolovatelného dělení, tedy typické vlastnosti nádorových buněk, a to bez ohledu na normální dělicí se buňky, kterými jsou například hematopoetické prekurzory, buňky vlasových váčků či epitelální buňky gastrointestinální sliznice.<sup>219</sup> Důsledkem těchto léčebných přístupů jsou časté vedlejší účinky spojené s oslabením rezerv buněk kostní dřeně, vypadáváním vlasů nebo nevolností. Zájem vědců se proto v současné době soustředí na vývoj léků, které budou mít oproti konvenční terapii vyšší terapeutický index, tzn. široké koncentrační rozmezí, v němž zničí nádorové buňky, aniž by poškodily zdravou tkáň.<sup>220</sup> Klasickým příkladem takových léčiv jsou antibiotika a antimykotika, jejichž cíle se u lidí nevyskytují. Otázkou je, zda se i v nádorových buňkách nachází molekuly nepřítomné v normální tkáni. Onkogenní bodové mutace některých signálních proteinů by mohly takovým případem, ovšem design látek selektivně blokujících pouze tyto cíle bez ovlivnění jejich nemutovaných protějšků je extrémně složitý. Jednodušším způsobem jak zvýšit selektivitu protinádorových léčiv je vysledovat kvantitativní změny dané onkogenní molekuly u nádorových buněk a tuto pak ovlivnit.

Řadu let bylo velkým otazníkem, proč někteří pacienti odpovídají na danou léčbu lépe než druzí, přičemž nové genetické technologie pomáhají tento problém rozluštit. Pro úspěšnou terapii je totiž nutné znát kromě onkogenního cíle též genetické

pozadí pacienta. Základy konceptu, který odhaluje genové interakce a může posloužit k selekci vhodných skupin pacientů, byly položeny už ve 20. letech minulého století a postupně zdokonalovány až do současnosti. Při studiu mutací u *Drosophila melanogaster* sledoval Calvin Bridges, že mají jisté kombinace letální účinky.<sup>221</sup> Název syntetická letalita dodal tomuto jevu Theodore Dobzhansky roku 1946.<sup>222</sup> V principu se jedná o stav, kdy přítomnost jednoho genu umožňuje buňce tolerovat genetické změny v druhém genu. Pokud je ovšem mutován i gen první, puffovací kapacita systému mizí, což je pro buňku letální (**Obrázek 4a,b**). Pomocí tohoto konceptu by se dala vyřešit dlouhotrvající problematika terapií nádorů s potlačenou či zcela redukovanou expresí nádorových supresorů. Prakticky jedinou možností léčby daných onemocnění byly doposud genové terapie, které jsou poněkud složité, a navíc se často nedostavuje kýžený efekt. Synteticky letální interakce jsou ale zcela běžné též mezi geny se zvýšenou expresí, a mohou být tedy univerzálně využity pro personalizovanou léčbu.

K identifikaci SL interakcí se nejprve používaly modelové organismy. Roku 1999 byla vytvořena knihovna mutantů *Saccharomyces cerevisiae*, u níž byl každý čtecí rámec nahrazen genetickým markerem a ten byl ohraničen z obou stran specifickými oligonukleotidovými značkami (20 bází), které sloužily jako „čárové kódy“ pro daný kmen.<sup>223</sup> Křížení kmenů poskytlo haploidní dvojité mutanty, což sice pomohlo k určení SL interakcí, ale bez možnosti kvantifikace. K tomuto účelu posloužilo zavedení univerzální sekvence obklopující čárové kódy, které umožnily jeho amplifikaci pomocí PCR.<sup>224</sup> Ačkoli byly takto odhaleny mnohé SL interakce, bylo nutné využít pro studium složitější organismy, a to především kvůli absenci četných lidských ortologů u kvasinek. Z toho důvodu se začaly provádět genetické experimenty též na *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* či *Mus musculus*, které navíc usnadnily aplikaci RNA interference. Vzhledem ke komplikacím spojeným s antivirální odpovědí savčích buněk na transfekci siRNA, byla tato molekula nahrazena shRNA zakódovanou v plasmidovém nebo virálním vektoru.<sup>225,226</sup> Dnešní genetika už ke studiu používá přímo lidské buněčné linie. Existují zde pak dva základní přístupy, kdy první je založen na experimentech s různými liniemi charakterizovanými sledovanou mutací a druhý pracující s isogenním párem, který byl uměle vytvořen mutací objektu zájmu. Obě strategie mají ovšem jisté nedostatky. Pomocí isogenních linií lze sice přesně identifikovat SL interakci, ale pouze u daného genotypu. Samotná RNA interferenční strategie se navíc jeví mnohdy nedokonalá z důvodu nekompletního umlčení

studovaného genu a častých vedlejších cílů. Případná protinádorová léčba tudíž vyžaduje pečlivou validaci odhalených SL interakcí v nezávislých modelech. Koncept syntetické letality byl následně rozšířen použitím inhibitorů sledovaných makromolekul, které jsou aplikovány na panel linií s mutacemi celé škály genů.<sup>227</sup> Kombinace mutace a inhibitoru ústící v buněčnou smrt pak svědčí o SL vztahu.

Úspěch olaparibu či iniparibu v léčbě prsních nádorů s delecí BRCA-1 (breast cancer 1) nebo BRCA-2 je pravděpodobně nejznámějším příkladem syntetické letality. Během opravy jednořetězcových zlomů v DNA dochází k autopolyribosylaci PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1), kdy se takto modifikovaná molekula stává dokovacím místem pro vazbu dalších proteinů zapojených do opravy poškozené DNA. V případě inhibice PARP-1 pomocí olaparibu resp. iniparibu se tvoří mnoho jednořetězcových zlomů, které mají v místě replikačních vidliček za následek vznik dvouřetězcových zlomů. Buňky s normální funkcí BRCA-1 a BRCA-2 jsou schopné opravit tato poškození prostřednictvím homologní rekombinace. Pokud ovšem dané proteiny chybí, anomálie bývá opravena nehomologním spojováním konců, což vede ke zkracování DNA a následně k buněčné smrti. Podobným příkladem SL interakce je vztah mezi BRCA-2 a Rad52.<sup>228</sup> Rad52 je zapojen do rozpoznání a opravy zlomů v DNA, pokud je ovšem deletován u BRCA-2 deficientních buněk, dochází ke vzniku rozsáhlých chromosomálních aberací s následnou buněčnou smrtí. Jiným často mutovaným genem je *myc*, jehož nadměrná exprese byla sledována u mnoha nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že buňky se zvýšenou hladinou tohoto proteinu jsou letálně citlivé k aplikaci agonistů DR5, receptoru pro TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand).<sup>229</sup> Jak se v poslední době ukazuje, SL interakce jsou velmi časté a jejich odhalování má mimořádný význam pro účinnější léčbu nádorových onemocnění.

### **3.1. CDK jako synteticky letální partneři jiných genů**

Jak již bylo zmíněno dříve, aplikace klasických protinádorových terapií má velmi často neblahé účinky, které mohou být potlačeny kombinací konvenčních cytostatik s nízkomolekulárními inhibitory CDK. Klinické studie pak ukazují, že obě složky dané léčby synergicky zesilují svoje účinky, a to i v nižších koncentracích než při monoterapii. Příkladů takových kombinací je celá řada, kterou jsme zpracovali v našem přehledném článku (viz **Příloha 1**).<sup>230</sup> Flavopiridol jakožto nejvíce studovaný

inhibitor CDK byl testován s mnoha látkami včetně docetaxelu, paclitaxelu či SN-38, přičemž za synergickými účinky stojí nejspíše potlačení opravy DNA poškození v důsledku zacílení CDK regulujících tento proces.<sup>164,231,232</sup> Ovlivnění mechanismů kontrolujících genomovou integritu se tudíž jeví jako velmi účinná strategie.

Co se týče syntetické letality s CDK, doposud bylo odhaleno několik potencionálně klinicky využitelných interakcí. Na základě úspěchu PARP inhibitorů v léčbě prsních nádorů byly sledovány další interakce s proteiny zapojenými do odpovědi na DNA poškození. Mezi nově identifikovanými geny byla objevena CDK5, jejíž umlčení u buněk HeLa ošetřených PARP inhibitorem KU0058948 vyvolalo fosforylaci  $\gamma$ H2AX, nárůst RAD51 ohnisek, což vedlo k selhání opravy jednořetězcových zlomů s následnou buněčnou smrtí.<sup>233</sup> Tato studie navíc odhalila doposud nepopsanou funkci CDK5 jakožto kontrolního bodu S fáze, který v případě DNA poškození předchází mitose. O přesném mechanismu působení není zatím příliš známo, ačkoli se spekuluje o interakci s kinasami reagujícími na poškození DNA či napojení na SCF ubiquitinligasu. Dále se ukázalo, že v SL vztahu s PARP je i CDK12, jejíž deficiencie způsobila u buněk odvozených od rakoviny vaječníků po aplikaci olaparibu selhání homologní rekombinace, a to pravděpodobně v důsledku potlačené exprese *BRCA1*, *FANCI*, *FANCD2* a *ATR*.<sup>234</sup>

Mezi často mutované nádorové supresory se řadí VHL (Von Hippel Lindau), jehož snížená produkce byla sledována mezi jinými i u nádorů ledvin. Při normální koncentraci kyslíku dochází k hydroxylaci HIF- $\alpha$  (hypoxia-inducible factor  $\alpha$ ), kdy modifikované aminokyseliny slouží jako vazebné místo pro VHL, který následně polyubiquitinyluje HIF- $\alpha$ , čímž ho označuje k degradaci. Nedostatek kyslíku naopak vede k akumulaci HIF- $\alpha$ , jenž interaguje s HIF- $\beta$ , a takto vzniklý heterodimer působí jako transkripční faktor několika genů včetně *VEGF*, *PDGF-B* (platelet derived growth factor B), *TGF $\alpha$*  (transforming growth factor  $\alpha$ ) či *EPO* (erythropoietin).<sup>235</sup> S využitím isogenních linií odvozených právě od nádorů ledvin byla pomocí siRNA strategie mezi jinými detekována CDK6 jako SL partner s VHL.<sup>236</sup> Tato interakce byla následně potvrzena použitím CDK4/CDK6 inhibitoru CAS 546102-60-7, který blokoval pouze růst VHL<sup>-/-</sup> buněk.

Vzhledem k vysoké incidenci mutací K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) a jeho obtížnému farmakologickému zablokování byly rovněž zkoumány SL interakční vztahy, přičemž se skutečně podařilo objevit protein, jehož inhibice potlačuje růst nádorů se zvýšenou hladinou K-Ras. Jelikož je K-Ras součástí mitogenní

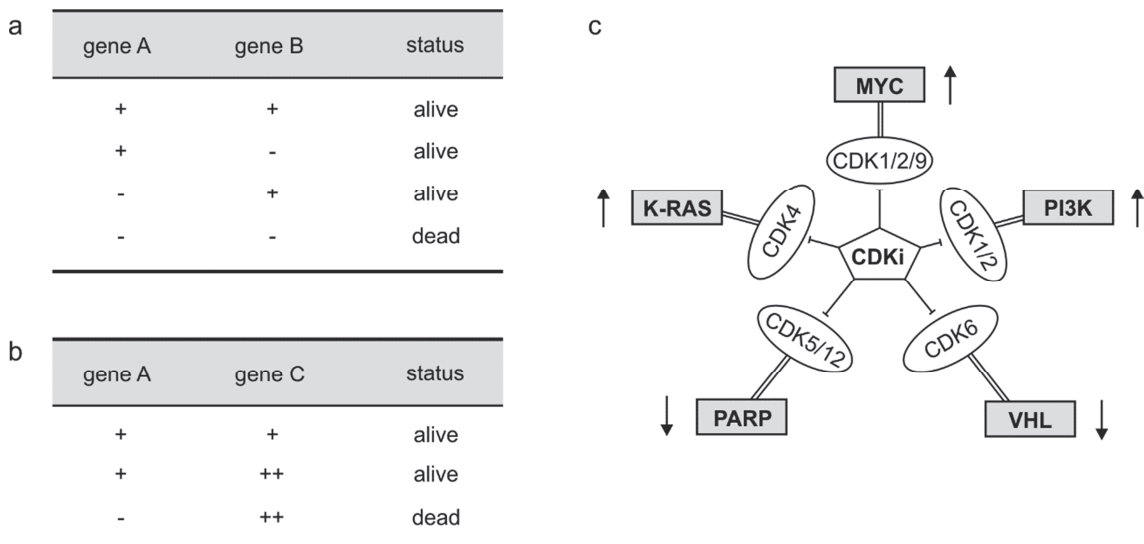


signalizace, nebylo překvapením, že se nově identifikovanou SL molekulou stala CDK4.<sup>237</sup> Nádorové linie s nadměrnou expresí byly totiž citlivé k umlčení CDK4, a navíc se ukázalo, že indukce exprese K-Ras u myších xenograftů se ztrátou CDK4 vedla k redukci nádorů.

Několik SL vztahů s CDK bylo objeveno i u onkogenů rodiny Myc. U linií odvozených od nádorů prsu s nadměrnou produkcí Myc, které neodpovídají na hormonální terapii (trojitě negativní vůči receptoru pro estrogen, progesteron a HER2) došlo po umlčení CDK1 k indukci apoptosy, a navíc byl potlačen i růst myších xenograftů.<sup>238</sup> Aplikace purvalanolu A a dinaciclibu pak měla stejný dopad na viabilitu trojitě negativních linií se zvýšenou expresí Myc jakožto i myších xenograftů.<sup>239</sup> Za mechanismem účinku pravděpodobně stojí potlačená fosforylace antiapoptotického proteinu survivinu v důsledku inhibice CDK1.<sup>240,241</sup> Kromě CDK1 byl potvrzen SL vztah též mezi CDK2 a MYCN.<sup>242</sup> Umlčení CDK2 totiž indukovalo apoptosu u neuroblastomových linií se zvýšenou produkcí MYCN, kdy simultánní umlčení CDK2 a MYCN nemělo vliv na buněčnou viabilitu. K SL partnerům Myc v neposlední řadě patří CDK9, jejíž farmakologická inhibice stejně jako genetické umlčení měly protinádorové účinky u linií odvozených od hepatocelulárního karcinomu s nadměrnou hladinou Myc.<sup>243</sup>

SL s CDK by mohla být využita také při terapii doposud obtížně léčitelného glioblastomu. Ukázalo se totiž, že imidazopyridin PIK-75, jenž byl původně považován především za inhibitor PI3K (phosphoinositide 3-kinase), blokuje též CDK1 a CDK2, a u linií odvozených od glioblastomu s normální funkcí PTEN indukuje apoptosu.<sup>244</sup> Při genetickém umlčování se ukázalo, že samotná inhibice CDK1 či CDK2 po použití PI3K inhibitoru neovlivňuje viabilitu glioblastomových buněk s normální funkcí PTEN, což svědčí o vzájemné kompenzaci obou kinas, zatímco simultánní umlčení CDK1 a CDK2 výrazně indukují apoptosu buněk ovlivněných PI3K inhibitorem.

V posledních letech byla vyvinuta celá řada CDK inhibitorů, i když jejich uplatnění v léčbě nádorových onemocnění bylo zatím rozporuplné. Na základě popsaných příkladů SL vztahů je však zřejmé, že medicínální chemie zaměřená na syntézu nových CDK inhibitorů má význam. Pro optimální terapii bude ale nutné identifikovat nové genové interakce a zároveň znát genetické pozadí daných chorob.



**Obrázek 4** Koncept syntetické letality a příklady synteticky letálních vztahů s CDK (převzato z Vymětalová & Kryštof 2016).

#### 4. Protein Mcl-1, regulátor apoptozy

Jak se ukázalo, při léčbě mnoha onemocnění vyznačujících se nadměrnou proliferací určitého typu buněk, se jeví velmi vhodnou strategií indukovat jejich apoptosu. Jednou z klíčových molekul řídících tento proces je antiapoptotický protein Mcl-1, jehož častá deregulace zdůrazňuje potřebu objevení přístupu, který pomůže potlačit jeho hladinu. Pro efektivní způsob zacílení je pak nutné znát strukturu a stejně tak i funkce tohoto proteinu.

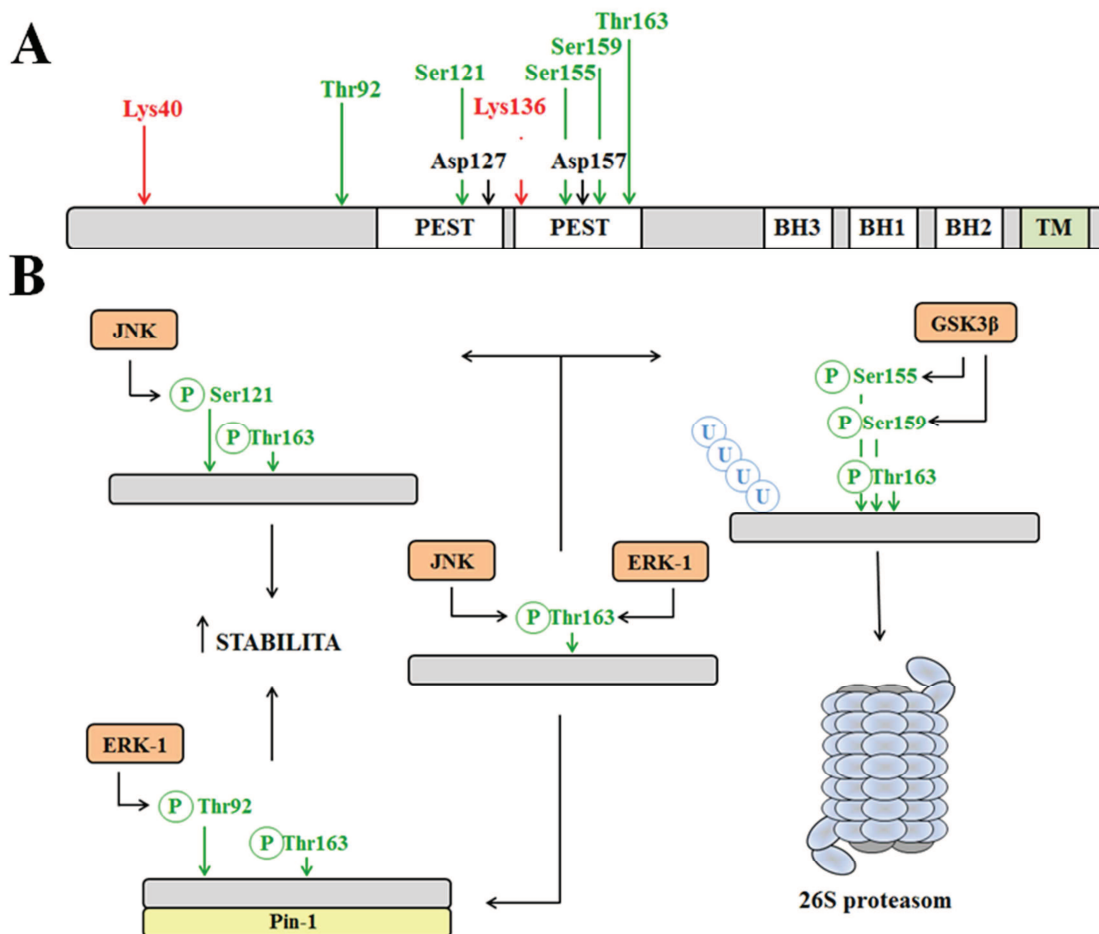
*Mcl-1* byl původně identifikován jako raný gen exprimovaný během diferenciace buněk myeloidní linie ML-1 a zároveň byla prokázána sekvenční podobnost s antiapoptotickým proteinem Bcl-2, který je součástí rodiny proteinů regulujících apoptotické procesy.<sup>245</sup> Její členy lze na základě funkcí a přítomnosti Bcl-2 homologních domén (BH) rozdělit do tří skupin. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W (Bcl-2-like protein 2) a Bcl2A1 (Bcl-2-related protein A1) obsahují BH1-4 domény včetně transmembránové (TM) sekvence a vykazují antiapoptotickou aktivitu. Bax, Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) a Bok (Bcl-2 related ovarian killer) mají podobnou strukturu, ačkoli postrádají BH4 doménu a podporují apoptosu formováním porů ve vnější mitochondriální membráně, které propouští cytochrom *c* do cytosolárního prostoru, kde dochází k tvorbě apoptosomu a aktivaci kaspas. Poslední a zároveň největší skupina je prezentována proteiny pouze s BH3 doménou, a to Bik

(Bcl-2-interacting killer), Hrk (harakiri, Bcl-2-interacting protein), Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death), Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bid (BH3-interacting domain death agonist), Puma, Noxa (*lat.* zničení, phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) a Bmf (Bcl-2 modifying factor), jejichž vazba na Bax, Bak či Bok vede k formaci pórů, ale jsou také schopné zablockovat funkce antiapoptotických proteinů vazbou BH3 helikální části do hydrofobní kapsy tvořené BH1-3 doménami.<sup>246</sup> Je tedy zřejmé, že poměr mezi jednotlivými členy rodiny řídí viabilitu buněk a narušení rovnováhy vede ke vzniku nejrůznějších onemocnění.

*Mcl-1* je umístěn na chromosomu 1q21, přičemž obsahuje 3 exony a nejméně 2 polyadenylační místa. Během sestřihu mRNA mohou vzniknout 3 různé varianty, a to Mcl-1L kódující protein s 350 aminokyselinami (AK), TM a BH1-3 doménami, dále Mcl-1S s 271 AK postrádající BH1,2 a TM a Mcl-1ES se 197 AK rovněž bez BH1,2 a TM (Kim et al 2009).<sup>247,248</sup> Krátké formy se podobají proteinům s BH3 doménou, a jsou tudíž schopné vykonávat proapoptotické funkce vazbou k Mcl-1L. Všechny varianty Mcl-1 se liší od ostatních členů Bcl-2 rodiny obsahem specifických sekvencí bohatých na Pro, Glu, Ser a Thr (PEST) na N-konci, které jsou typické pro proteiny s krátkým poločasem rozpadu (u Mcl-1 méně než 1 h).<sup>249</sup>

Mcl-1 je cílem četných posttranslačních modifikací řídicích především jeho stabilitu. Ústřední roli hraje pravděpodobně fosforylace Thr163 prostřednictvím ERK-1 (extracellular signal-regulated kinase 1) či JNK (c-Jun N-terminal kinase).<sup>250-252</sup> Následná fosforylace Thr92 a kontakt s Pin1 vede ke zvýšené stabilitě, stejně jako fosforylace Ser121 pomocí JNK. Thr163 ovšem slouží také jako základ dalších fosforylací Ser155 a Ser159 prostřednictvím GSK3 $\beta$ , které mají za následek označení proteinu  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase) a jeho degradaci v 26S proteasomu (**Obrázek 5**). Kromě fosforylačně závislého odbourávání je Mcl-1 konstitutivně odstraňován u neovlivněných i stresovaných buněk pomocí Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase), která interaguje s BH3 hydrofobní vazebnou kapsou Mcl-1.<sup>253,254</sup>

Jednou z nejdůležitějších funkcí Mcl-1L je vazba proapoptotických proteinů Bak a Bax. Po zahájení apoptosy Bik, Noxa a tBid vytěsní a nahradí oba proteiny, což umožní jejich oligomerizaci a další apoptotické kroky.<sup>255-257</sup> Aktivace kaspasy 3 navíc vede ke štěpení Mcl-1L za Asp127 resp. Asp157, kdy vzniká C-proapoptotický fragment.<sup>258</sup> Mcl-1 je také schopný interagovat s PCNA (proliferating cell nuclear antigen), což má za následek zablockování buněčného cyklu v S-fázi.<sup>259</sup> Vazba



**Obrázek 5** Posttranslační modifikace Mcl-1. **A** Souhrn modifikovatelných míst. **B** Kinyasy řídí osud Mcl-1.

proteolytického fragmentu Mcl-1 k CDK1 vede k její snížené aktivitě a zastavení v G2/M fázi a interakce s CHK1 (check kinase 1) zase k akumulaci buněk v G2 fázi v závislosti na fosforylaci CHK1 pomocí ATR.<sup>260,261</sup>

Komplexní funkce Mcl-1 v rámci celého organismu byla zkoumána pomocí podmíněných mutací, kdy Mcl-1 deficientní myši vykázaly již periimplantační letalitu.<sup>262</sup> Delece Mcl-1 během rané diferenciace lymfocytů zastavila jejich vývoj a zároveň u nich indukovala apoptosu, která byla detekována i u zralých B a T buněk s Mcl-1 deficiencí.<sup>263</sup> Mcl-1 delece u raných hematopoetických progenitorů zase způsobila ztrátu kostní dřeně, což prokázalo, že je Mcl-1 kritický regulátor udržující homeostázu hematopoetických kmenových buněk.<sup>264</sup>

Během posledních let byl prokázán mimořádný význam Mcl-1 exprese u mnoha nádorových onemocnění včetně chronické myeloidní leukémie, B-buněčného lymfomu, chronické lymfoidní leukémie, lymfomu plášťových buněk, mnohočetného myelomu,

hepatocelulárního, pankreatického a testikulárního karcinomu, rakoviny děložního čípku, melanomu a nemalobuněčného karcinomu plic.<sup>265-275</sup> Ke zvýšené expresi Mcl-1 často přispívá vliv nejrůznějších cytokinů a růstových faktorů, které aktivují četné signální dráhy zahrnující MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK, PI3K či Jak (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription).<sup>276</sup> IL-6 (interleukin 6) aktivoval u linie odvozené od mnohočetného myelomu a buněk cholangiokarcinomu STAT3, jehož konstitutivní aktivace byla esenciální i pro přežívání diferencovaných makrofágů.<sup>277-279</sup> zase ukázali, že IL-3 zapíná signalizaci PI3K/proteinkinasa B/CREB (c-AMP response element-binding protein) resp. p38MAPK/PU.1 vedoucí k nadměrné produkci Mcl-1.<sup>280,281</sup> Popsání zapojení Mcl-1 v nádorové transformaci vedlo ke snaze eliminovat právě tuto molekulu a poměrně efektivní se jeví potlačení její transkripce pomocí CDK inhibitorů.<sup>152,178,179,282</sup> Naše studie prokázala, že potlačení jeho exprese prostřednictvím nízkomolekulárních transkripčních inhibitorů vede k rapidnímu poklesu viability a indukci apoptosy u mnohočetného myelomu (nepublikované výsledky).

Ačkoli se mnoho let pouze spekulovalo o spojení mezi rakovinou a zánětem, mnohé epidemiologické studie tuto myšlenku potvrdily, a navíc se ukázalo, že zánětlivé složky jsou přítomné v mikroprostředí většiny neoplastických tkání.<sup>283</sup> Genetické změny vedoucí ke vzniku nádorů jednak samy o sobě podněcují prozánětlivé procesy, jejichž mediátory ještě více prohlubují genetickou nestabilitu, ale je též prokázáno, že chronické záněty včetně infekcí či autoimunitních onemocnění způsobují vznik mnoha malignit. Zasažení imunitní odpovědi může být tudíž využitelné i při léčbě rakoviny. Neutrofilů, které jsou součástí přirozené imunitní odpovědi, by se mohly stát jedním z cílů takových terapií. Vznik zánětlivých či autoimunitních onemocnění je totiž často spojen s inhibicí jejich apoptosy a nadměrnou aktivací některých funkcí. Jelikož je pro udržování životaschopnosti neutrofilů klíčový právě Mcl-1, mohly by CDK inhibitory indukovat jejich apoptosu. Naše nově syntetizované CDK inhibitory skutečně snižovaly viabilitu neutrofilů izolovaných z krve zdravých dárců v důsledku snížené exprese *Mcl-1*, potlačovaly účinky GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) a blokovaly tvorbu ROS (reactive oxygen species) (Vymětalová et al v příloze, **Příloha 3**).

## 5. Neutrofilly, základní složky imunitní odpovědi

Zánět jakožto proces představuje klíčový prvek antimikrobiálního imunitního systému, který byl pečlivě střežen během evoluce v průběhu milionů let. Tato základní buněčná obrana byla zároveň nepřetržitě zdokonalována díky mikroorganismům napadajícím lidské tělo a také mechanismům, jež dané patogeny vyvíjely při snaze uniknout imunitní obraně. Za normálních podmínek nejrůznější imunitní elementy navzájem spolupracují při odhalování nežádoucích mikrobů, jako jsou bakterie, houby či viry, a zajišťují jejich eliminaci před případným zmnožením, šířením a poškozením jiných částí lidského těla. V konečné fázi je pak nutné, aby aktivované zánětlivé buňky podlehly apoptose a byly odstraněny z místa zánětu, což vede k návratu k původnímu počtu imunitních činitelů a obnovení tkáňové homeostasy.<sup>284</sup>

### 5.1. Zrání, mobilizace a aktivace neutrofilů

Granulocyty představují první buněčné typy, které jsou přitahovány do infikovaných oblastí v obrovském množství, kde poté využívají svůj obranný materiál při odstraňování nežádoucích podnětů. Neutrofilly, známé též pod názvem polymorfonukleární leukocyty, tvoří nejpočetnější populaci bílých krvinek ( $2,0-7,5 \times 10^9/l$ ). Jejich název byl odvozen od zbarvení histologických preparátů při použití hematoxylinu a eosinu. Na rozdíl od basofilů a eosinofilů, které se barví modře resp. červeně, neutrofilní komponenty zůstávají neutrálně růžové. Neutrofilly se vyvíjí v kostní dřeni z  $CD34^+$  pluripotentních kmenových buněk v dráze zahrnující následující fáze: myeloblast, promyelocyt, myelocyt a metamyelocyt, a to v závislosti na řadě faktorů jako IL-3, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) nebo GM-CSF.<sup>285,286</sup> Pod vlivem chemotaktických signálů, jakými jsou například LPS (lipopolysaccharide), fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  nebo IL-17, produkovaných v místech zánětu jsou neutrofilly vychytávány endoteliálními buňkami z cévního řečiště prostřednictvím interakce mezi P- a E-selektiny na povrchu endotelu a PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) a L-selektinu konstitutivně exprimovaných neutrofilů.<sup>287-289</sup> Během následného kutálení po endotelu dochází k aktivaci signálních kaskád zahrnujících Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase), Syk (spleen tyrosine kinase), PI3K a MAPK, což vede v důsledku k expresi  $\beta 2$  integrinů, které zakotví neutrofil po vazbě na ICAM-1

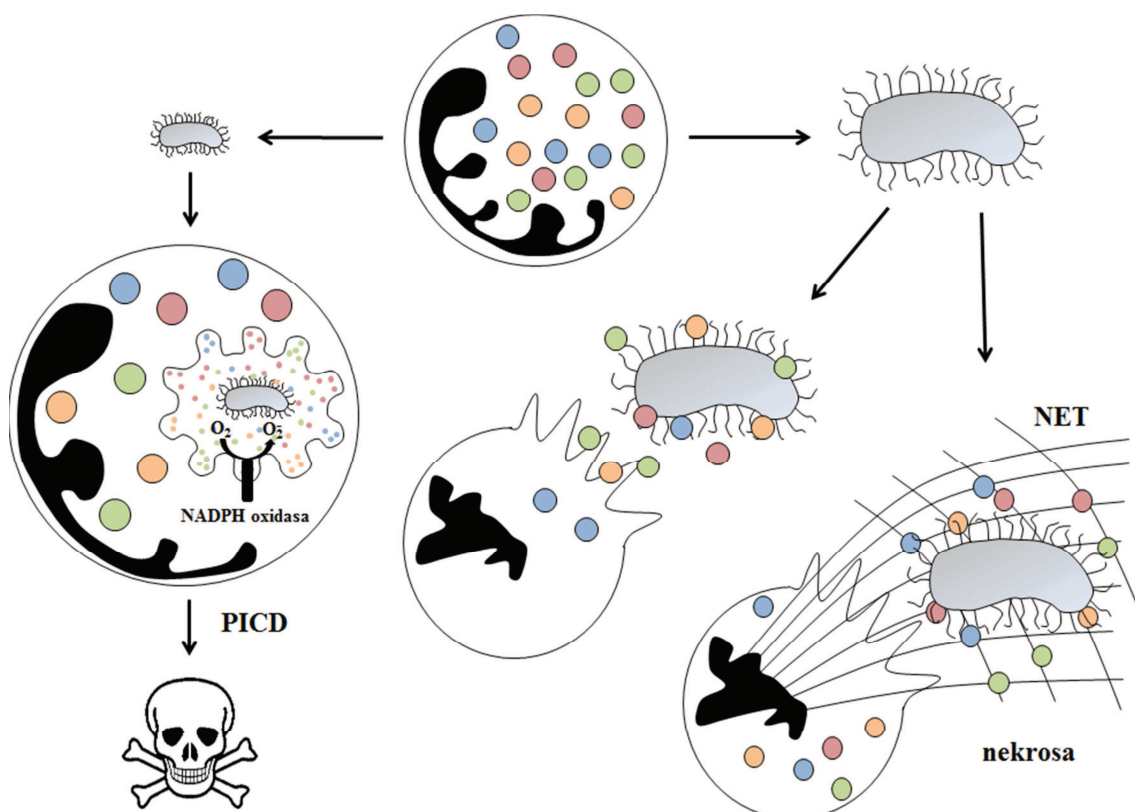
(intercellular adhesion molecule 1) v jednom místě.<sup>290-292</sup> Následně dochází k transmigraci neutrofilu podél endoteliálních spojů, vysunutí lamelipodia a další chemotaxi ke zdroji signálu.

## 5.2. Eliminace škodlivých faktorů

Vzhledem k rozmanitosti patogenních druhů a nespočtu jejich toxických efektů vyvinuly neutrofilny pestrou škálu antimikrobiálních prostředků, které se zdatně liší v mechanismech účinku tak, že jsou schopny postihnout nejrůznější procesy nezbytné pro vznik, rozvoj a šíření infekce.

Jako zástupci granulocytů obsahují neutrofilny 3 základní typy granulových struktur, jmenovitě azurofilní (primární), specifické (sekundární) a terciární nazývané také jako gelatinové. Navíc se v jejich cytoplasmě nachází tzv. sekreční granule, které na rozdíl od předešlých organel nevznikají odštěpením z Golgiho aparátu, nýbrž endocytosou.<sup>293</sup> Tyto váčky slouží jako rezervoár membránových receptorů, které jsou po fúzi granulí s cytoplasmatickou membránou aktivovány interakcí s cílovými molekulami, což vede k mobilizaci terciárních granulí obsahujících metaloproteasy jako je gelatinasa nebo leukolysin, jejichž aktivace napomáhá průniku neutrofilu přes bazální membránu.<sup>294,295</sup> V místě infekce pak dochází k uvolnění obsahu specifických a azurofilních granulí do extracelulárního či fagosomálního prostoru. Specifické váčky jsou jednak zdrojem mnoha antimikrobiálních sloučenin včetně laktoferinu, lysozymu nebo NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), ale v jejich membráně je navíc ukotvena důležitá komponenta NADPH oxidasy flavocytochrom b558 zajišťující iniciaci oxidativního vzplanutí (viz níže).<sup>296,297</sup> Mobilizace azurofilních granulí vede konečně k uvolnění kompletního toxického materiálu včetně defensinů, lysozymu, neutrofilní elastasy, proteinasy 3, katepsinu G nebo MPO (myeloperoxidase).<sup>298</sup>

Oxidativní vzplanutí a tvorba ROS představuje další obrannou strategii proti nežádoucím patogenům. Během degranulace dochází k formování NADPH oxidasy katalyzující přenos elektronu na molekulární kyslík za vzniku superoxidu, který podléhá rapidní přeměně na peroxid vodíku nebo reaguje s oxidem dusnatým při tvorbě ještě agresivnějšího peroxynitritu. Uvnitř fagosomu MPO katalyzuje produkci kyseliny chlorovodíkové v reakci chloridového iontu s peroxidem vodíku.<sup>298</sup> Antimikrobiální účinky HCl se následně projeví v přímé reakci s patogenem a zároveň nepřímo po modifikaci aminových skupin proteinů na chloraminy, které mají rovněž toxické vlastnosti.<sup>299</sup>



**Obrázek 6** Odstranění nežádoucích patogenů neutrofilů.

Pro uplatnění zmíněných strategií je nutný bezprostřední kontakt neutrofilu s původcem infekce, který je zajištěn dvěma způsoby. Pokud je mikroorganismus dostatečně malý, může být pohlcen při tzv. fagocytose. Po vytvoření fagosomu začíná mobilizace specifických a primárních granulí, tyto fúzí s fagosomální membránou, a jejich obsah tak konečně přichází do kontaktu s patogenem. Navíc se na membráně formuje NADPH oxidasový komplex produkující ROS. Fagocytosa také napomáhá iniciaci apoptosy neutrofilu v procesu nazývaném PICD (phagocytosis-induced cell death).<sup>300</sup> Druhým způsobem interakce s patogenem je tvorba NET (neutrophil extracellular traps).<sup>301</sup> Jedná se o vláknité struktury složené z dekonenzovaného chromatinu, histonů a granulárních proteinů, které zachycují nejrůznější mikroorganismy, a vystavují je tak vysoké koncentraci toxických látek (**Obrázek 6**).<sup>298</sup>

### 5.3. Konečná fáze zánětlivé reakce

V posledním stádiu imunitní odpovědi probíhá nejen odstranění apoptotických a nekrotických neutrofilů, čímž se vyrovnává jejich původní hladina, ale dochází i k produkci protizánětlivých faktorů, které napomáhají ustavení tkáňové rovnováhy.



Jakmile neutrofil splní svou obrannou funkci, podléhá buněčné smrti a zároveň vysílá signály sloužící jako atraktanty makrofágů. Nejznámějšími zástupci těchto molekul jsou EMAPII (endothelial-monocyte activating polypeptide II), trombospondin 1, LPC (lysophosphatidylcholine) a S1P (sphingosine-1-phosphate).<sup>302</sup> Specifické rozpoznání nekrotických a apoptotických buněk je pak zajištěno pomocí interakce makrofágových receptorů s ligandy v cytoplasmatické membráně neutrofilu, případně využívají další rozpustné molekuly jako prostředníky těchto kontaktů.<sup>303</sup> Během několika posledních let bylo identifikováno mnoho takových signálů, ovšem nejvíce prostudovanou molekulou zodpovědnou za odstranění odumírajícího neutrofilu se stal fosfatidylserin, který je při apoptose vystaven ve vnější vrstvě cytoplasmatické membrány. U živých buněk je jeho pozice ve vnitřní vrstvě udržována pomocí aminofosfolipidtranslokasy, jejíž aktivita během buněčné smrti klesá.<sup>304,305</sup> Po zachycení neutrofilu dochází k aktivaci signálních drah zahrnujících rodinu Rho (Ras homology) GTPas ovlivňujících změnu cytoskeletálního uspořádání, následnou tvorbu fagosomu a rozštěpení jeho obsahu na základní elementy.<sup>303</sup>

Na rozdíl od počáteční fáze imunitní reakce, kdy neutrofil sekretují zánětlivé lipidové molekuly typu prostaglandinů a leukotrienů, v závěrečném stádiu přepínají svůj expresní profil a produkují lipoxiny, resolviny a protektiny.<sup>298</sup> Tyto sloučeniny blokují další příliv neutrofilů i jejich případnou aktivaci, a navíc podporují fagocytosu prostřednictvím makrofágů, které následně syntetizují protizánětlivé cytokiny jako je TGF- $\beta$  a IL-10.<sup>306,307</sup>

#### **5.4. Patologická aktivita neutrofilů u některých zánětlivých onemocnění**

Zánětlivé choroby postihují nejrůznější části lidského těla a vznikají v důsledku řady imunitních defektů. Často dochází k nadměrným a dlouhotrvajícím obranným reakcím v situaci, kdy není organismus schopen eliminovat patogen nebo jinou cizorodou částici, což poté vede k poškození tkáně. V jiných případech byla prokázána imunitní reakce vůči antigenům tělu vlastním. V následujícím přehledu budou popsány příčiny a následky vzniku některých zánětlivých onemocnění spojených s nesprávnou funkcí či prodlouženou životností neutrofilů.

Vaskulitida je používána jako souhrnný název pro několik různých onemocnění způsobených produkcí protilátek vůči MPO (p-ANCA) a proteinase 3 (c-ANCA)

neutrofilů.<sup>308</sup> Vytvořené imunitní komplexy aktivují neutrofilly, které podléhají degranulaci, dochází k produkci superoxidu, zánětlivých cytokinů a tvorbě extracelulárních sítí.<sup>309</sup> Nejznámějšími onemocněními jsou Wegenerova granulomatóza napadající malé cévy v dýchacím ústrojí za tvorby granulomů a glomerulonefritida postihující ledviny.

Systémový lupus erythematosus napadá četné tkáně a orgány včetně kůže, ledvin, kloubů, srdce a dalších. Toto rovněž autoimunitní onemocnění způsobuje obranná reakce vůči jadernému chromatinu neutrofilů a antimikrobiálnímu peptidu katelicidinu LL37.<sup>310,311</sup> Vzniklé imunitní komplexy stimulují tvorbu neutrofilních extracelulárních sítí (NETosa), které aktivují pDC (plasmacytoid dendritic cells) produkující IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) prostřednictvím TLR9 (Toll-like receptor 9). IFN $\gamma$  podporuje další NETosu neutrofilů a celý proces se opakuje.

V případě bulosního pemfigoidu je imunitní reakce namířena proti hemidesmosomálním proteinům BP180 a BP230, které v komplexech s protilátkami podporují uvolnění gelatinasy B degradující  $\alpha$ 1-proteinasový inhibitor elastasy a ta následně rozštěpí BP180, přičemž vzniklé peptidy slouží jako atraktanty dalších neutrofilů.<sup>312</sup> U pacientů s bulosním pemfigoidem se často vyskytují podkožní puchýře objevující se zprvu na končetinách a následně též na trupu. Bulosní epidermolýza je zase způsobena tvorbou protilátek proti kolagenu typu VII tvořící vláknité struktury, které zpevňují přechod mezi pokožkou a škárou. Bulosní epidermolýza se projevuje převážně tvorbou puchýřů na kůži, ale také na sliznicích. Pro vývoj tohoto onemocnění je nutná funkce NADPH oxidasy, což bylo prokázáno experimentem, kdy byl geneticky umlčen Ncf1 (neutrophil cytosolic factor 1), který je její podjednotkou. Myší modely s Ncf1 delecí byly rezistentní vůči experimentální bulosní epidermolýze, přičemž injekce Ncf1<sup>+/+</sup> granulocytů obnovila náchylnost k této chorobě.<sup>313</sup>

Ovšem nejznámějším autoimunitním onemocněním s nejvyšší incidencí je revmatoidní artritida (RA). Původcem vzniku této choroby je tvorba protilátek proti několika různým antigenům, z nichž byly doposud prokázány následující: kolagen typu II, cyklické citrulinované peptidy a Fc fragmenty IgG.<sup>314</sup> RA postihuje především kloubní spojení, kde neutrofilly syntetizují v počáteční fázi LTB4 (leukotriene B4), který posléze autokrinně aktivuje BLT1 (LTB4 receptor), a tím podporuje příliv neutrofilů.<sup>315</sup> Imunitní komplexy složené ze zmíněných antigenů stimulují syntézu IL-8 neutrofilly, což vede k jejich další masivní migraci.<sup>316</sup> Přítomné imunokomplexy jsou v tomto stádiu rovněž zodpovědné za aktivaci neutrofilního Fc $\gamma$  receptoru, následnou

degranulaci a produkci ROS.<sup>317</sup> V konečné fázi dochází k destrukci kolagenové matrix, synoviální hyperplazii za vzniku ztlustělé membrány zvané pannus, která izoluje chrupavku od výživné synoviální tekutiny, odumírání chondrocytů a v závěru ke kostní erozi.

## 5.5. Léčba zánětlivých a autoimunitních onemocnění

Současné terapie většiny zánětlivých a autoimunitních onemocnění jsou převážně založeny na modifikaci funkcí neutrofilů. Nejhojněji používanými léky se staly kortikosteroidy, které snižují produkci ROS, degranulaci a migraci do místa zánětu a DMARD (disease-modifying antirheumatic drugs) potlačující navíc syntézu chemoatraktantu LTB<sub>4</sub>.<sup>318,319</sup> Vzhledem k nespecifitě těchto léků, a tudíž častým vedlejším účinkům se moderní medicína intenzivně věnuje vývoji sloučenin, které by selektivně postihly deregulované buněčné procesy.

Mezi prvními signálními drahami zapojenými do patogeneze RA byla identifikována Jak/STAT kaskáda spouštějící expresi zánětlivých cytokinů a genů podporujících přežívání buňky.<sup>320,321</sup> Výzkum léčby RA se proto zaměřil na vývoj nízkomolekulárních inhibitorů Jak, z nichž byl už jeden schválen pro terapii pokročilých stádií RA neodpovídající na aplikaci methotrexatu. Jedná se o pyrrolopyrimidin s názvem tofacitinib (CP-690,550), který preferenčně blokuje aktivitu Jak3 a Jak1.<sup>322</sup> Tofacitinib je orálně dostupný a jeho poločas rozpadu se pohybuje kolem 3 h. Mezi klinicky testované inhibitory se dále zařadil ruxolitinib (INCB018424) blokující Jak1 a Jak2.<sup>323</sup> Kromě Jak/STAT dráhy přispívají ke vzniku a rozvoji RA také MAPKkinasová a PI3K/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) signální dráha. Několik inhibitorů p38, včetně SCIO-469, VX-702 nebo pamapimodu, postoupilo až do klinických zkoušek, ve kterých se ukázalo, že i když tento typ látek potlačuje tvorbu C-reaktivního proteinu, v dlouhodobém měřítku postrádá účinnost.<sup>324-327</sup> Jedním z důvodů tohoto selhání může být zapojení p38 do protizánětlivých procesů. Za zmínku stojí též inhibitor Syk kinasy fosfatinib (R-788), jehož účinky byly ovšem v klinických testech léčby RA srovnatelné s účinky placeba.<sup>328</sup> Na základě těchto zjištění je nasnadě hledat nové přístupy jak zacílit aberantní imunitní procesy.

Vzhledem k faktu, že u mnoha zánětlivých onemocnění dochází k nepřiměřené proliferaci neutrofilů, se jeví mnohem účinnějším způsobem jejich léčby indukce

buněčné smrti.<sup>329</sup> Tento předpoklad byl potvrzen experimentem, ve kterém injekce apoptotických neutrofilů ochránila myši před smrtí způsobenou LPS.<sup>330</sup> Pro vytvoření efektivní strategie indukce apoptosy však bylo nejprve nutné komplexní prostudování apoptotických pochodů neutrofilů.

Apoptosa u neutrofilů může být stejně jako u ostatních buněk aktivována extracelulárními ligandy, které zapínají signální kaskádu řízenou receptory smrti, nebo narušením integrity mitochondriální membrány s následnou tvorbou apoptosomu. Kromě těchto dvou drah existuje u neutrofilu unikátní modifikace vnější apoptotické dráhy, kdy stárnoucí neutrofil není schopen udržet redoxní status, což vede k aktivaci sfingomyeliny prostřednictvím ROS, tvorbě ceramidu formujícího lipidové rafty, v nichž dochází k agregaci receptorů smrti a následně aktivaci kaspasy 8.<sup>331</sup>

Během intenzivního zkoumání apoptotických drah neutrofilu byla objevena zásadní funkce proteinu Mcl-1 v regulaci integrity mitochondriální membrány. Leuenroth et al (2000) ukázali, že množství Mcl-1 během stárnutí neutrofilu postupně klesá, čímž se narušuje rovnováha mezi pro- a antiapoptotickými proteiny Bcl-2 rodiny a následně dochází k indukci apoptosy.<sup>332</sup> Rovněž bylo prokázáno, že mnohé faktory podporující přežití (GM-CSF, LPS, butyrát sodný, IL-1 $\beta$ ) udržují konstantně vysoké hladiny Mcl-1.<sup>333</sup> Přesné mechanismy, které zodpovídají za regulaci Mcl-1, nejsou však doposud detailně známy, ačkoli jsou předmětem usilovného výzkumu.

O CDK, které byly původně považovány za regulátory buněčného dělení, se domnívalo, že by neměly být exprimovány terminálně diferencovanými neutrofilů bez proliferačního potenciálu. Klausen et al (2004) skutečně prokázali ztrátu exprese CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6 během diferenciací myeloidních progenitorů, ovšem v několika dalších experimentech byly naopak detekovány vysoké hladiny CDK7 a CDK9.<sup>334,7,6</sup> Během stárnutí pak dochází k poklesu CDK9 aktivity a pravděpodobně spolu s ní i Mcl-1.<sup>7</sup> Klíčová funkce CDK9 v regulaci životaschopnosti neutrofilu byla potvrzena její farmakologickou inhibicí pomocí flavopiridolu, DRB a roskovitinu, kdy došlo k potlačení exprese Mcl-1 a následně k indukci apoptosy.<sup>6</sup> Nedávné experimenty rovněž naznačily zapojení RNAPII do tohoto procesu, kdy inhibice CDK7 a CDK9 vede k potlačení fosforylace RNAPII, což má za následek pokles hladiny Mcl-1 a dále indukci apoptosy.<sup>6,7</sup>

Předešlé poznatky iniciovaly testování CDK inhibitorů proti nejruznějším zánětlivým onemocněním, přičemž nejvíce prostudovanou sloučeninou se stal roskovitin. Rossi et al (2006) využili při experimentech hned tři myší modely.<sup>335</sup>

U pasivně indukované artritidy došlo po podání roskovitinu k utlumení zánětlivé reakce už pět dnů po první injekci séra z artritické myši, což bylo prokázáno zlepšenými klinickými skóre. Roskovitin dále snížil celkový počet neutrofilů u modelu plicního poškození indukovaného bleomycinem a zároveň redukoval komplexní poškození tkáně. U akutního zánětu pohrudnice vyvolaného karagenanem došlo po intraperitoneálním podání roskovitinu ke snížení počtu zánětlivých buněk a redukcí edému. Roskovitin také indukoval apoptosu neutrofilů u myši s pneumokokovou meningitidou, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*.<sup>336</sup> Moriceau et al (2010) pak demonstrovali obnovení potlačené apoptosy neutrofilů izolovaných z pacientů s cystickou fibrosou.<sup>337</sup> Podrobnější studium mechanismu indukce apoptosy neutrofilů pomocí CDK inhibitorů ukázalo závislost na aktivaci kaspas.<sup>335,7</sup> CDK inhibitory byly navíc natolik účinné, že dokázaly potlačit účinky několika faktorů (LPS, GM-CSF, db-cAMP) podporujících přežívání neutrofilu.<sup>335</sup>

## **6. Metody**

### **6.1. Analýza buněčného cyklu**

Po ovlivnění byly buňky naznačeny 10  $\mu$ M BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) 30 min při 37°C, sklizeny trypsinizací, zcentrifugovány při 200 g po dobu 5 min, promyty PBS, zafixovány v 70% ethanolu a denaturovány v 2M HCl. Po neutralizaci byly buňky inkubovány s fluorescenčně značenou protilátkou proti BrdU, promyty, obarveny propidium jodidem a analyzovány pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter).

### **6.2. Imunofluorescence**

Suspenzi buňky byly po ovlivnění zcentrifugovány při 200 g po dobu 5 min, rozsuspendovány v čerstvém médiu a inkubovány se sklíčky pokrytými polylysinem 20 min při 37 °C. Poté byla sklíčka dvakrát opláchnuta PBS a fixována ve směsi methanolu a acetonu (1:1) 30 min při -20 °C. Sklíčka byla dále rehydratována během 10 min v PBS, promyta médiem s 10% fetálním telecím sérem a inkubována s primární protilátkou 1 hod při pokojové teplotě. Následně byla sklíčka třikrát promyta PBS a inkubována s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou 1 hod opět při pokojové teplotě. Po inkubaci byla sklíčka třikrát promyta PBS, jádra byla obarvena pomocí DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (MP Biomedicals), naposled promyta vodou a zamontována na mikroskopická sklíčka pomocí Mowiolu (Calbiochem). Fluorescence byla sledována na mikroskopu Olympus BX50 s digitální kamerou Olympus DP71.

### **6.3. Stanovení cytotoxicity**

Cytotoxicita testovaných sloučenin po 72 hod inkubaci byla stanovena buď pomocí roztoku Calcein AM (Sigma Aldrich) nebo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich). V prvním případě byl k buňkám přidán roztok Calcein AM a po hodinové inkubaci byla změřena fluorescence vzniklého produktu pomocí destičkového readeru Fluoroscan Ascent (Labsystems) při 485/538 nm. V druhém případě bylo do každé jamky přidáno MTT (0,5 mg/ml) s následnou inkubací při 37°C po dobu 4 hod. Vzniklý produkt byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l DMSO (dimethyl sulfoxide) a absorbance byla změřena pomocí destičkového readeru Synergy H4 Hybrid Multi-mode (BioTek) při 570 nm. Z výsledných křivek byly stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub>, tedy koncentrace látek letální pro 50 % buněk.

#### **6.4. Test inhibice proteinkinás**

Komplex CDK2/cyklin E byl produkován v hmyzích buňkách Sf9 s využitím bakulovirální infekce a purifikován na NiNTA (nickel-nitrilotriacetic acid) (koloně (Qiagen). CDK5/p35 byl zakoupen od firmy ProQinase GmbH. Reakční kinasová směs obsahovala 1 mg/ml histonu H1, 15 či 0,15  $\mu\text{M}$  ATP pro CDK2 resp. CDK5, 0,05  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP a testovanou sloučeninu v celkovém objemu reakčního pufru 10  $\mu\text{l}$  (60 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)-NaOH, pH 7,5; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{MnCl}_2$ , 3  $\mu\text{M}$  orthovanadát sodný, 1,2 mM DTT (dithiothreitol), 2,5  $\mu\text{g}$  / 50  $\mu\text{l}$  PEG<sub>20 000</sub> (polyethylene glycol)). Reakce byla zastavena přidávkem 5  $\mu\text{l}$  3% vodného roztoku  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Alikvoty byly pipetovány na P-81 fosfocelulosový papír (Whatman), třikrát promyty 0,5% vodným roztokem  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a vysušeny na vzduchu. Kinasová inhibice byla kvantifikována pomocí FLA-7000 digitálního obrazového analyzátoru (Fujifilm).

#### **6.5. SDS-PAGE a imunodetekce**

Po ovlivnění byly buňky zlyzovány ve vzorkovacím pufru Laemmli, proteiny byly separovány na SDS-polyakrylamidovém gelu a pomocí elektroblotingu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly dále blokovány v 5% roztoku nízkotučného mléka či 3% roztoku telecího sérového albuminu (v 0,1% Tweenu 20 v PBS, PBS-T), inkubovány s roztoky primárních protilátek přes noc při 4 °C, třikrát promyty v PBS-T, inkubovány hodinu s roztoky peroxidasou značených sekundárních protilátek a opět třikrát promyty PBS-T. Peroxidasová aktivita byla detekována pomocí ECL reagentů (AP Biotech) a kamery LAS 4000 (Fujifilm). Intenzita proteinových pásů byla analyzována programem Multi-Gauge.

#### **6.6. Sledování aktivity kaspas 3 a 7**

Buňky byly po ovlivnění homogenizovány v extrakčním pufru (10 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), 1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 0,2 % CHAPS, inhibitory proteas, pH 7,4) na ledu 20 min. Homogenáty byly dále centrifugovány při 10 000 g a 4 °C po dobu 30 min. Po kvantifikaci koncentrace proteinů metodou Bradfordové byly lyzáty naředěny na stejnou koncentraci a inkubovány 3 hod se 100  $\mu\text{M}$  Ac-DEVD-AMC v reakčním pufru (25 mM PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), 2 mM EGTA, 2 mM

MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 7,3). Fluorescence vzniklého produktu byla změřena pomocí destičkového readeru Fluoroscan Ascent (Labsystems) při 355/460 nm.

### **6.7. RNA interference**

Buňky byly nejprve zcentrifugovány při 200 g 5 min a pelet byl rozsuspendován v 100 µl PBS. Následně byly k suspenzi přidány různé siRNA duplexy (Dharmacon) a pro kontrolu úspěšné transfekce siGLO indikátor (Dharmacon). Vzniklý roztok byl přenesen do kyvety (Lonza) a elektroporován pomocí nukleofektoru (Amaxa). Poté bylo k suspenzi přidáno 500 µl předeřátého kultivačního média a celý obsah byl přenesen pomocí Pasteurovy pipety (Lonza) do média v Petriho misce, kde probíhala další kultivace.

### **6.8. Měření RNA syntézy**

Pro označení DNA byly buňky 24 hod před měřením ovlivněny [<sup>14</sup>C]thymidinem (60 Bq/ml v růstovém médiu). Sledování vznikající RNA bylo umožněno přidáním [<sup>3</sup>H]uridinu ( $7 \times 10^5$  Bq/ml) 30 min před měřením. Buňky byly následně dvakrát promyty vychlazeným PBS a precipitovány 10% vychlazenou TCA (trichloroacetic acid). Precipitát byl poté separován pomocí kolonek s filtrem (Invitex), promyt 5% TCA, dH<sub>2</sub>O a nukleové kyseliny byly vymyty 1M NaOH. Množství <sup>3</sup>H a <sup>14</sup>C v eluátech bylo simultánně kvantifikováno LS6500 kapalinným scintilačním počítačem (Beckman Coulter). Relativní syntéza RNA byla určena poměrem <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C pro každý vzorek a jeho srovnáním s poměrem u neovlivněných kontrolních buněk.

### **6.9. Izolace a kultivace lidských neutrofilů**

Neutrofilů byly izolovány z krve zdravých dárců podle dříve popsaného protokolu.<sup>338</sup> Krev byla odebrána do zkumavek obsahujících EDTA, do kterých byl dále přidán 2% dextran zajišťující sedimentaci erytrocytů. Neutrofilů byly poté izolovány ze separované plazmy diskontinuální centrifugací s využitím Percoll gradientu hustoty (Sigma Aldrich, Poole, Velká Británie) a rozsuspendovány v RPMI 1640 médiu (Sigma Aldrich) doplněným 10% teplem inaktivovaným fetálním telecím sérem (Sera Laboratories International, Bolney, Velká Británie), 2 mM glutaminem, 100 U/ml penicilinem a 100 µg/ml streptomycinem (Sigma Aldrich). Kultivace poté probíhala při 37 °C v inkubátoru s 5% CO<sub>2</sub>.



## **6.10. Stanovení tvorby ROS neutrofilů**

Hladina ROS generovaná po příslušném ošetření buněk byla detekována pomocí předešle popsaného postupu.<sup>339</sup> Neutrofilů byly nejprve zcentrifugovány při 250 g po dobu 5 min při pokojové teplotě a poté rozsuspendovány v solném roztoku HBSS (Gibco). Obsah jamek byl přenesen do neprůhledné 96 jamkové desky (Greiner Bio-One GmbH) a do každé jamky byl přidán roztok luminolu ve finální koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Měření luminiscence v odpovědi na přidávek 2,5  $\mu\text{M}$  fMLP bylo provedeno pomocí luminometru (Centro LB 960, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Německo) v intervalu od 1. do 30. min.

## **6.11. Sledování apoptosy neutrofilů**

Ovlivněné buňky v 96 jamkovém panelu byly nejprve jednou promyty PBS, zcentrifugovány při 250 g po dobu 5 min při 4 °C a poté rozsuspendovány ve 100  $\mu\text{l}$  Annexin V pufru (10 mM HEPES, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Následně byl přidán 1  $\mu\text{l}$  anti-Annexin V FITC (fluorescein isothiocyanate)-konjugované protilátky na jamku a buňky byly inkubovány 10 min při laboratorní teplotě. Pro sledování pozdně apoptotických a nekrotických neutrofilů byly buňky po předchozí inkubaci dále obarveny propidium jodidem ve finální koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Poté byl obsah jamek přenesen do FACS vialek a fluorescence byla měřena průtokovým cytometrem (BD Accuri C6 Flow Cytometer, Accuri Cytometers Inc.). Určení apoptotické populace bylo stanoveno jako procenta Annexin V pozitivních a zároveň propidium jodid negativních buněk.

## **6.12. Posouzení jaderné morfologie neutrofilů**

Po příslušném ovlivnění byly neutrofilů zcentrifugovány na sklíčko při 300 g po dobu 5 min a obarveny pomocí komerčního roztoku May-Grünwald-GIEMSA. Morfologie jader byla následně sledována světelnou mikroskopií.

## **6.13. Test migrace neutrofilů**

Experimenty byly provedeny podle dříve popsaného protokolu.<sup>340</sup> Skleněná kapilára byla potažena HUVEC buňkami (human umbilical vein endothelial cells), které byly aktivovány 2 h TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Aparaturou proudilo médium za podmínek simulujících fyziologický stav (0,1 Pa, 37 °C). Pro studium účinků neutrofilů byly tyto

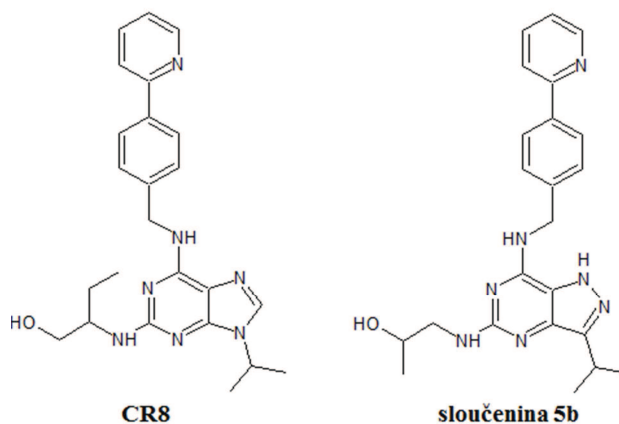
buňky aplikovány do systému a počet kutálejících se, adherujících i transmigrovaných neutrofilů byl mikroskopicky zaznamenáván v intervalu 20 min.

## 7. Diskutované výsledky

### 7.1. 5-substituované 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny jako nové účinné CDK inhibitory s protinádorovým potenciálem

Ve snaze vyvinout analoga roskovitinu se zlepšenými CDK inhibičními vlastnostmi a silnější antiproliferační aktivitou jsme se zaměřili na modifikaci pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinového skeletu, jelikož bylo již dříve prokázáno, že překonává účinky příslušných purinových sloučenin.<sup>341,342</sup> K vyšší účinnosti daných inhibitorů přispívá mj. H-vazba tvořená N2 pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinového skeletu a Glu81.<sup>341</sup> Substituenty byly zvoleny na základě studií vztahů mezi strukturou a aktivitou purinů a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů.<sup>341,190</sup> N6 biaryl u látky CR8 se ukázal jako vhodná modifikace zesilující účinky purinového skeletu, a proto byl do pozice 7 pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu zaveden též [(2-pyridyl)benzyl]amin.<sup>188,343</sup> Isopropyl byl ponechán na stejném místě jako u CR8, jelikož se osvědčil jako vhodný substituent, který vyplňuje malou hydrofobní kapsu hluboko v aktivním místě.<sup>343</sup> Do pozice 5 pak bylo vneseno 20 různých substituentů. Pro biologické a biochemické studie byly připraveny dříve nepopsané sloučeniny, jejichž struktury byly ověřeny NMR spektroskopií, ESI hmotnostní spektrometrií a elementární analýzou. Čistota produktů byla zkontrolována HPLC-DAD analýzou. Syntézu a chemické analýzy prováděl doc. Ing. Libor Havlíček, CSc. (Ústav experimentální botaniky AV ČR).

Všech 20 sloučenin bylo následně testováno na inhibici CDK2 a CDK5 (**Tabulka 1, Příloha 2**). Výsledky byly porovnány s referenční CR8, kdy většina látek byla účinnější než CR8 s  $IC_{50} < 100$  nM. Z naměřených hodnot  $IC_{50}$  je navíc patrné, že



**Obrázek 1** Chemické struktury CR8 a sloučeniny **5b**.

substituent v poloze 5 značně přispívá ke zvýšené účinnosti pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu. Bylo prokázáno, že už malé substituenty s koncovou aminoskupinou zvyšují afinitu inhibitoru k CDK2, ovšem s rostoucí délkou alifatického řetězce se aktivita sloučeniny snižuje.<sup>342</sup> V našich experimentech jsme pozorovali podobný efekt, neboť u látek s methylsulfanylem a methylsulfonylem v pozici 5 byl znatelný malý nárůst v inhibici CDK2 i CDK5. Nejvýhodnějším řetězcem se však jeví hydroxyalkylamin a aminoalkylamin. Toto zjištění navíc podporují i předchozí pozorování u purinů, pyrazolo[1,5-*a*]triazinů i pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů.<sup>188,342,344-347</sup> U aromatických substituentů ve stejné poloze naopak dochází k poklesu aktivity ( $IC_{50} > 1 \mu M$ ), což opět koresponduje s dřívějšími výsledky s purinovými inhibitory.<sup>347</sup> 4-aminocyklohexyl ve stejné pozici u purinů byl ovšem prokázán jako velmi výhodný substituent interagující prostřednictvím dvou H-vazeb s Asp145 a Thr14 CDK2.<sup>343</sup> 2-aminocyklohexyl u pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů zvýšil afinitu inhibitoru k CDK2, ale oproti předchozí studii došlo u sloučeniny s 4-aminocyklohexylem k téměř desetinásobnému poklesu účinnosti.<sup>342</sup> Tento poznatek je v rozporu s předchozí studií a zůstává otázkou, co stojí za tímto pozorovaným rozdílem. Následně jsme porovnali jednu z neaktivnějších substancí **5b** s dinacliclibem v inhibici několika CDK (**Tabulka 2, Příloha 2**). Naše sloučenina **5b** vykázala podobný inhibiční profil jako dinacliclib s nižší účinností pro CDK1. Na panelu 50 dalších proteinkinasek se ukázalo, že **5b** efektivně blokuje také PAK4 (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4) a CK1δ (casein kinase 1δ), které jsou cíli jak strukturně podobných purinů tak i dalších pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů (**Tabulka S1, doplňková data k Příloze 2**).<sup>188,192,342,348</sup>

U všech 20 derivátů jsme dále sledovali jejich antiproliferační vlastnosti na 4 nádorových liniích různého původu (**Tabulka 1, Příloha 2**). Význam substituce pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu v poloze 5 byl zřetelný při srovnání  $IC_{50}$  3,7-disubstituovaného pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu s CR8, kde byl sledován téměř desetinásobný pokles cytotoxicity u 3,7-disubstituovaného pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu oproti CR8. Zavedení substituce do polohy 5 pak znatelně zlepšuje protinádorové účinky dané sloučeniny, kdy hodnoty  $IC_{50}$  klesají od 1  $\mu M$  změřeného pro 3,7-disubstituovaný pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin až k nízkým nanomolárním koncentracím pro testovanou látku. Nejeftivnější byly v našich testech opět sloučeniny s hydroxyalkylaminovým resp. aminoalkylovým řetězcem, které byly až 10x účinnější než CR8. Stejně tak nebylo překvapením, že se hodnoty  $IC_{50}$  u pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů s aromatickými řetězci v pozici 5 pohybovaly

v mikromolárních koncentracích. Poměrně zajímavé bylo pozorování snížené aktivity látek s cyklickými aminy ve stejné poloze ( $IC_{50} > 100$  nM), jelikož v biochemických testech byly naměřeny nízké nanomolární CDK inhibiční koncentrace. U podobného typu purinových sloučenin lišících se mírně v pozicích 6 a 9 byl ovšem pozorován opačný efekt, kdy se při obměně alifatického řetězce za cyklický razantně zvýšila cytotoxicita.<sup>343</sup>

Pro zjištění mechanismu účinku jedné z nejúčinnějších sloučenin celé série, látky **5b**, jsme využili buněčný model kolorektálního karcinomu. U linie HCT-116 došlo při aplikaci zvyšující se koncentrace **5b** k poklesu počtu buněk v S fázi a zároveň k nárůstu subG1 populace, která svědčí o přítomnosti apoptotických buněk (**Obrázek 2, Příloha 2**). Navíc byl sledován blok buněčného cyklu v pozdní S a G2/M fázích. Indukce G1 bloku byla zřetelná až při nejvyšší testované koncentraci (500 nM). Tato pozorování naznačují, že látka **5b** potlačuje DNA replikaci a proliferaci pravděpodobně v důsledku CDK2 inhibice. Velmi pravděpodobně dochází také k inhibici transkripční CDK7 a CDK9, neboť sloučenina **5b** způsobuje pokles proteinu Mcl-1 (**Obrázek 3, Příloha 2**). Biochemický test aktivace kaspas 3 a 7 dále ukázal nárůst aktivity obou enzymů už při 63 nM **5b**. Pokles detekovaný při 500 nM je častým jevem pozorovaným při aplikaci vysoké koncentrace testované sloučeniny a je pravděpodobně spojen s intenzivní degradací všech buněčných proteinů. Indukce vnitřní apoptotické dráhy naší látkou **5b** byla dále potvrzena i detekcí štěpného fragmentu PARP-1 pomocí imunoblotu.

Jelikož bylo potvrzeno, že je aktivita CDK2 důležitá pro růst primárního i metastazujícího melanomu, rozhodli jsme se studovat účinky nových sloučenin na linii G361 odvozenou právě od tohoto typu nádoru. Všechny testované sloučeniny účinně potlačovaly fosforylaci CTD domény RNA polymerasy II na Ser2 i Ser5, což vedlo k poklesu proteinové hladiny Mcl-1, aktivaci kaspas 3 a 7 a štěpení PARP-1, a to při výrazně nižších koncentracích než CR8 (**Obrázek S2 a S3, doplňková data k Příloze 2**).

Vzhledem k málo prostudovaným funkcím CDK5 nebyla protinádorová účinnost CDK inhibitorů zatím spojována s její inhibicí. Mezi experimentálními protinádorovými léčivy doposud nejsou žádné inhibitory CDK5. Nedávná studie však naznačuje zapojení CDK5 do nádorové transformace.<sup>349</sup> V závislosti na aktivaci MAP kinasové signální dráhy dochází prostřednictvím CDK5 k fosforylaci Ser732 FAK (focal adhesion kinase), která poté interaguje s mikrotubuly dělicího vřeténka a přispívá k jejich

depolymerizaci. Hladina P-Ser732 FAK byla u interfázních nádorových buněk oproti mitotickým buňkám stěží detekovatelná. Inhibice CDK5 roskovitinem vedoucí k poklesu P-Ser732 FAK způsobuje defekty ve formování vřeténka, a tím i v uspořádání chromosomů v ekvatoriální rovině. Je tedy zřejmé, že inhibice CDK5 u nádorových buněk může postihnout jejich viabilitu. Vzhledem ke strukturální podobnosti mezi CDK2 a CDK5 nebylo překvapením, že naše sloučeniny inhibovaly se srovnatelnou účinností obě kinasy (**Tabulka 1, Příloha 2**). Pro potvrzení výsledků z biochemického testu jsme detekovali proteinovou hladinu P-Ser732 FAK po ovlivnění buněk HCT-116 látkou **5b**, kde jsme pozorovali její koncentračně závislý pokles (**Obrázek 2, Příloha 2**).

## 7.2. Trisubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny potlačují funkce neutrofilů a indukují jejich apoptosu

Deregulace viability či funkcí neutrofilů je typickým jevem spojeným s rozvojem chronických zánětlivých či autoimunitních onemocnění, jejichž léčba je i navzdory pokroku ve vývoji léků stále komplikovaná, a navíc je často doprovázena vedlejšími účinky. Nedávné studie však naznačují, že by právě CDK inhibitory mohly pomoci při řešení tohoto problému. Ukázalo se totiž, že roskovitin indukoval apoptosu neutrofilů prostřednictvím blokování funkcí RNAPII vedoucí ke snížené expresi Mcl-1, tvorbě pórů v mitochondriální membráně, uvolnění cytochromu *c*, formování apoptosomu a aktivaci kaspas.<sup>335</sup> Navíc byl schopný překonat i účinky antiapoptotických sloučenin GM-CSF, LPS a dibutyryl-cAMP. V *in vivo* testech pak znatelně utlumil akutní zánět pohrudnice vyvolaný karagenanem, snížil poškození plic způsobené bleomycinem a potlačil pasivně indukovanou artritidu u myší. Na základě těchto faktů předpokládáme, že by nově vyvíjená analoga roskovitinu mohla mít podobné účinky.

Pro studium proapoptotických účinků jsme vytvořili knihovnu 42 derivátů roskovitinu, kterými jsme ovlivnili neutrofilu izolované z krve zdravých dárců (**Obrázek 5, Příloha 3**). Inkubace s jednotlivými látkami probíhala 8 h při jednotné koncentraci 10 nM. Pro analýzu apoptotické populace byly buňky dvojité naznačeny Annexinem V a propidium jodidem a analyzovány průtokovým cytometrem. Nejúčinnější sloučeniny série LGR3437 a LGR3465 byly poté inkubovány s neutrofilu v koncentračně závislém množství 8 h a jejich vliv na viabilitu neutrofilů byl validován stejným způsobem jako v předešlém experimentu (**Obrázek 1A, Příloha 3**). LGR3437 stimulovala apoptosu při 10 nM s nárůstem apoptotických buněk až k 90 % při 100 nM ( $IC_{50}$  11,6 ± 1,3 nM). LGR3465 zvýšila podíl apoptotické populace nejméně o 5 % už při 0,1 nM ( $IC_{50}$  4,8 ± 2,5 nM). Pro potvrzení předchozího zjištění byla provedena morfologická analýza neutrofilních jader pomocí GIEMSA barvení (**Obrázek 1B, Příloha 3**). Při apoptose ztrácí jádro neutrofilů klasický laločnatý tvar a získává kruhovou strukturu. Po aplikaci obou látek v koncentraci 10 nM byla pozorována přítomnost většiny apoptotických buněk. Roskovitin (20 μM) podobně indukoval buněčnou smrt neutrofilů, kdy po 8 h inkubaci vzrostl počet apoptotických buněk až na 75 %.<sup>5</sup> Zajímavý je ovšem přechod od apoptotických neutrofilů k nekrotickým, neboť po 20 h inkubaci dochází po aplikaci roskovitinu k indukci sekundární nekrosy (60 %). Nicméně ve srovnání s roskovitinem jsou naše látky mnohonásobně účinnější.

Stejná skupina demonstrovala, že DRB, transkripční inhibitor aktinomycin-D a translační inhibitor cykloheximid podobně jako roskovitin indukují apoptosu neutrofilů.<sup>6</sup>

Za účelem zjištění mechanismu účinku jsme se zaměřili na analýzu hladin vybraných proteinů pomocí imunoblotu (**Obrázek 2A, Příloha 3**). Po 8 h ovlivnění neutrofilů oběma sloučeninami v závislosti na koncentraci postupně klesala hladina fosforylovaných forem RNAPII na Ser2 a Ser5 a stejně tak i proteinu Mcl-1. Naopak hladina proapoptotického proteinu Bak vykázala opačný trend, který byl výraznější v případě LGR3465. Při použití roskovitinu (20  $\mu$ M) Při detekci Mcl-1 jsme kromě klesající formy pozorovali nárůst těžšího proteinového pásu. Možným vysvětlením tohoto jevu může být detekce fosforylované varianty Mcl-1 na Thr163/Ser159 v jeho PEST sekvenci. Ačkoli fosforylace Thr163 prostřednictvím ERK1/2 stabilizuje Mcl-1 a zvyšuje viabilitu buněk, slouží zároveň jako templát pro fosforylaci Ser159 pomocí GSK3 $\beta$ . Tato modifikace následně vede k degradaci celého proteinu proteasomem.<sup>250-252</sup>

I když obě sloučeniny indukují apoptosu neutrofilů, jejich využití jako protizánětlivých léků závisí na schopnosti potlačovat účinky molekul prodlužujících přežívání neutrofilů. Vzhledem ke zvýšené hladině GM-CSF u mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění byl pro následující experimenty použit právě tento cytokin. V testech se prokázalo, že GM-CSF (10 ng/ml) skutečně potlačoval apoptosu neutrofilů, a to až o 20 % po 20 h inkubaci (**Obrázek 3A, Příloha 3**). Při použití obou látek u neutrofilů stimulovaných GM-CSF (10 ng/ml) došlo k nárůstu podílu apoptotických buněk průměrně o 30 %. Pro srovnání 20  $\mu$ M roskovitin obrátil antiapoptotický efekt indukovaný LPS (100 ng/ml) a TNF $\alpha$  (10 ng/ml) až o 40 %.<sup>5</sup> V dalším experimentu ve stejném uspořádání byla analyzována exprese Mcl-1 pomocí imunoblotu. U kontrolních buněk byl sledován postupný pokles Mcl-1, který byl patrný už po 6 h inkubaci, zatímco buňky stimulované GM-CSF exprimovaly i po 20 h inkubaci Mcl-1 ve srovnatelné míře jako kontrolní buňky. Aplikace LGR3437 i LGR3465 (1  $\mu$ M) způsobila rapidní pokles lehčí varianty Mcl-1 po 6 h, přičemž tato forma zcela vymizela už po 8 h. Naopak dříve detekovaný těžší pás byl pozorován po 6 h a během delších kultivací mírně narůstal. Podobně bylo ukázáno, že 20  $\mu$ M roskovitin potlačil už po 4 h expresi Mcl-1 u neutrofilů stimulovaných GM-CSF (50 ng/ml), LPS (100 ng/ml) i TNF $\alpha$  (10 ng/ml).<sup>5</sup> Tento efekt nebyl způsoben zasažením signálních drah zahrnujících NF $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells) a ERK spuštěných LPS a TNF $\alpha$ .



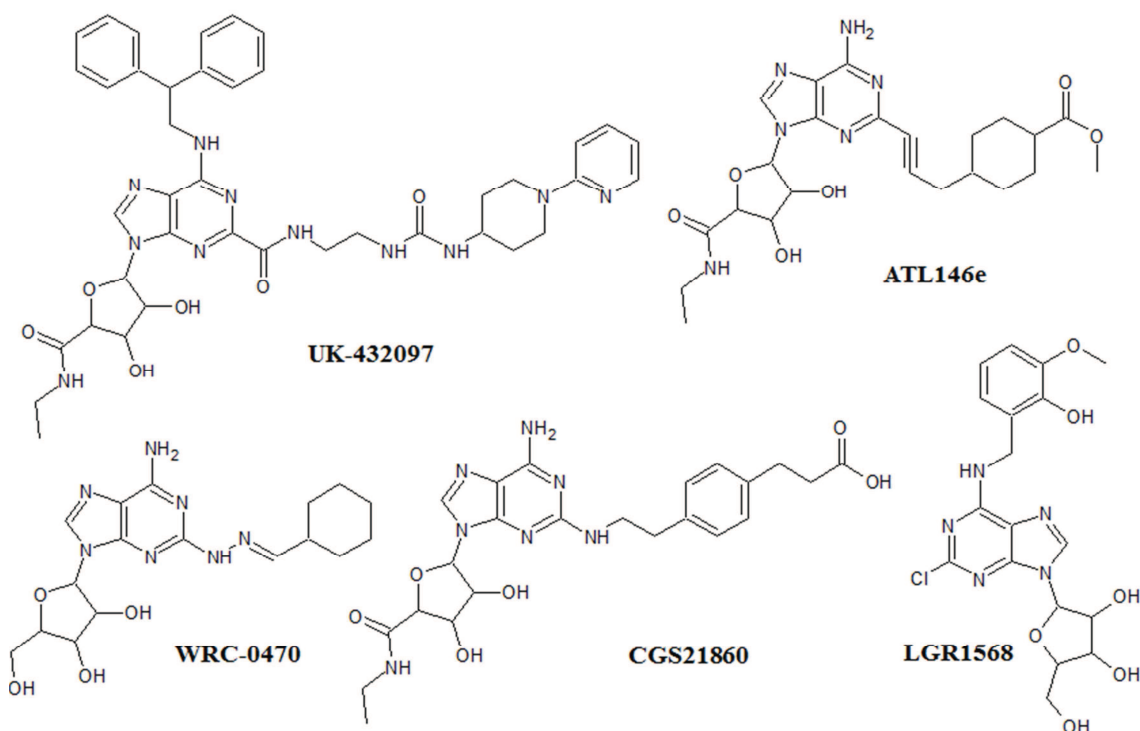
Kromě potlačení viability neutrofilů byla též sledována schopnost obou sloučenin tlumit jejich aktivitu (**Obrázek 4, Příloha 3**). Po 1 h inkubaci s LGR3437 a LGR3465 byly buňky ovlivněny GM-CSF (10 ng/ml) a následně stimulovány přídatkem fMLP (2,5  $\mu$ M). Produkce ROS byla sledována pomocí luminometru během 10 min intervalu. Inhibice tvorby ROS byla stanovena z nejvyššího bodu křivek, kde byl patrný koncentračně závislý pokles ( $IC_{50}$  2,5  $\mu$ M a 5,5  $\mu$ M pro LGR3437 resp. LGR3465). Na druhou stranu roskovitin (20  $\mu$ M) nebyl schopný potlačit produkci ROS po stimulaci neutrofilů PMA (phorbol ester).<sup>5</sup> Je možné, že koncentrace roskovitinu byla pro sledování žádaného efektu příliš nízká.

### 7.3. Nový syntetický nukleosid redukuje zánětlivé účinky neutrofilů

Přirozená odpověď organismu na nadměrnou imunitní reakci zahrnuje mezi jinými endogenní produkci adenosinu, a to buď přímým uvolněním z buněk prostřednictvím nukleosidových transportérů nebo extracelulárním katabolismem ektonukleotidasami CD39 (cluster of differentiation 39) a CD73.<sup>350,351</sup> Následně dochází k interakci adenosinu se 4 typy receptorů spřaženými s G proteiny, jmenovitě A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub>.<sup>352</sup> Za fyziologických podmínek stimuluje nízká hladina adenosinu (<1 μM) aktivitu A<sub>1</sub> a A<sub>3</sub>, což vede k inhibici produkce cAMP, zvýšené chemotaxi a fagocytose.<sup>353</sup> Během zánětu koncentrace adenosinu rapidně stoupá a dosahuje 10-100 μM, kdy dochází k aktivaci A<sub>2A</sub> stimulačím funkci adenylátcyklasy.<sup>353-355</sup> Tyto změny vedou k potlačení zánětlivých efektů včetně degranulace, adheze či syntézy leukotrienů.<sup>353</sup>

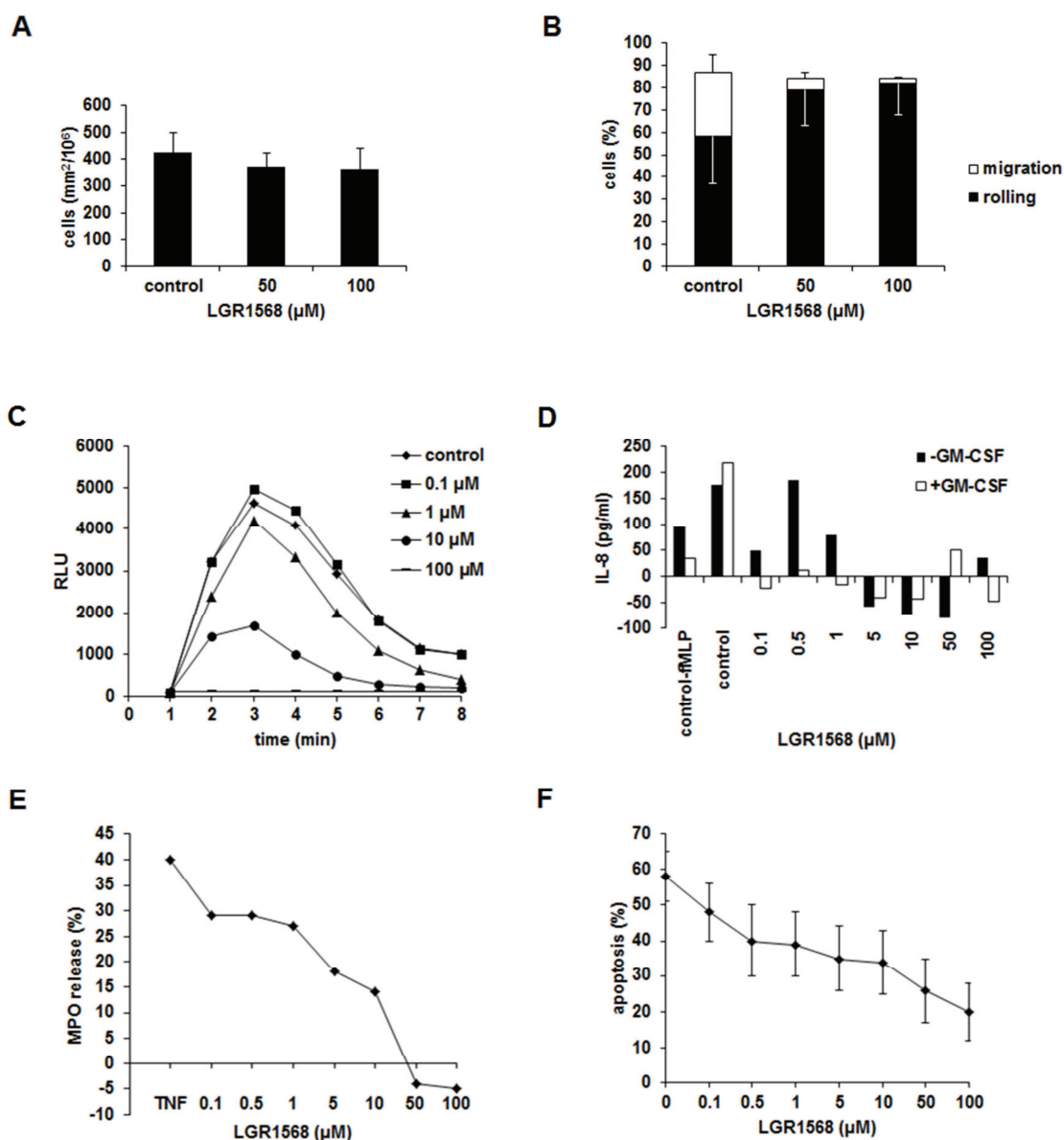
Terapeutické efekty adenosinu byly detailně zkoumány, ovšem jsou limitované jeho krátkým poločasem rozpadu (<10s) kvůli přeměně deaminasou na inosin nebo adenosinkinasou na AMP.<sup>353,356</sup> Navíc bylo prokázáno, že aplikace adenosinu může vyvolat nežádoucí vedlejší efekty jako je plicní otok, zúžení průdušek či dokonce srdeční infarkt.<sup>357</sup> Vývoj analogů adenosinu specificky aktivujících určitý typ receptoru by mohl mít tudíž i lepší terapeutické účinky. A<sub>2A</sub> receptor prezentující hlavní typ protizánětlivého efektoru neutrofilů vyvolal zájem vědců o vývoj jeho agonistů. Nejstudovanější sloučenina CGS21680 utlumila poškození tkání u myšního modelu artritidy vyvolané kolagenem, potlačila zánět pohrudnice vyvolaný karagenanem též u myši a redukovala poškození plic u pacientů s akutním respiračním syndromem.<sup>358-360</sup> Slibné výsledky poskytly také další agonisté jako regadenoson, WRC-0470 a ATL146e. Z krystalografické analýzy struktury A<sub>2A</sub> receptoru s navázaným agonistou UK-432097 vyplynulo, že účinný A<sub>2A</sub> agonista interaguje s receptorem prostřednictvím H-vazeb vytvářených oběma hydroxyskupinami ribosy, N6 a N7 purinového skeletu.<sup>361</sup> Další modifikace v pozici 4 u ribosy a poloze 2 u purinu zvyšuje afinitu vůči receptoru. Cílem této studie bylo charakterizovat účinky nově vyvinutého derivátu adenosinu LGR1568 na funkce neutrofilů a objasnit mechanismus jeho působení. Tato sloučenina byla nedávno popsána jako syntetický modulátor životaschopnosti neutrofilů (patent WO2010130233).<sup>362</sup>

Schopnost neutrofilů adherovat k vaskulárnímu endotelu a migrovat z krve do tkání je prvním krokem v zánětlivém procesu, jehož potlačení může napomoci



**Obrázek 1** Chemické struktury vybraných A<sub>2A</sub> agonistů.

při léčbě. Pro studium protizánětlivých účinků LGR1568 byl vytvořen kapilární systém s průtokem a tlakem napodobujícím *in vivo* vaskulaturu. Jeho stěny byly pokryty lidskými endoteliálními buňkami HUVEC stimulovanými TNF $\alpha$  a ovlivněnými na 30 min LGR1568 v koncentracích 50 a 100  $\mu$ M. Do systému byly poté aplikovány neutrofily ovlivněné LGR1568 při stejných koncentracích. Z výsledků je patrné, že LGR1568 mírně potlačuje adhezi neutrofilů, snižuje jejich transmigraci a zároveň podporuje kutálení (**Obrázek 1A,B**). V podobně navrženém experimentu se ukázalo, že CGS21680 rovněž inhibuje migraci neutrofilů přes uroepiteliální vrstvu buněk, a to dokonce i v přítomnosti uropatogenní *Escherichia coli*.<sup>363</sup> Z molekulárního hlediska stimuluje TNF $\alpha$  u neutrofilů expresi CD49d, který prostřednictvím interakce s VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) zajišťuje adhezi buňky k povrchu.<sup>364</sup> Při použití A<sub>2A</sub> agonisty ATL146e došlo k potlačení exprese CD49d a zároveň klesl počet neutrofilů adherovaných na povrch pokrytý VCAM-1.<sup>364</sup> Následně byla sledována inhibice aktivity neutrofilů stimulovaných 30 min GM-CSF (50 ng/ml) a 10 min LGR1568 v koncentrační řadě od 0,1 do 100  $\mu$ M. Produkce ROS byla sledována po přidavku 100 ng/ml fMLP luminometrem v 8 min intervalu. LGR1568 v závislosti na koncentraci postupně tlumila produkci ROS s absolutním poklesem při 100  $\mu$ M (**Obrázek 1C**). Podobně byla potlačena i produkce zánětlivého cytokinu IL-8 a uvolnění



**Obrázek 1** LGR1568 ovlivňuje funkce i viabilitu neutrofilů.

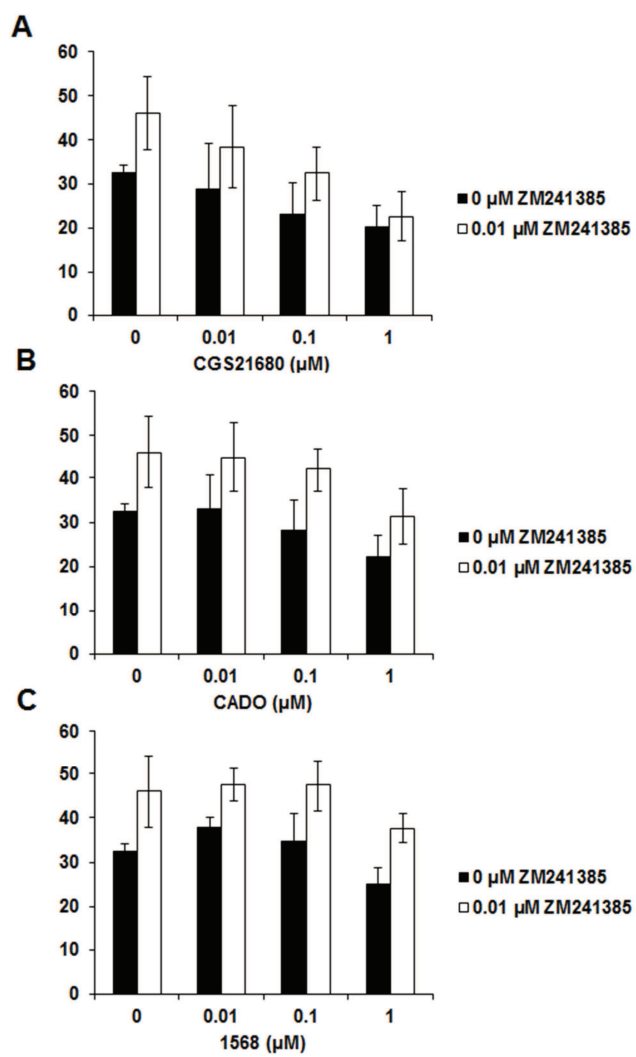
myeloperoxidasy (**Obrázek 1D,E**). Selektivní  $A_{2A}$  agonista WRC-0470 vykázal obdobné účinky na funkce neutrofilů, jelikož potlačil uvolnění superoxidu a zároveň inhiboval degranulaci.<sup>365</sup> Kromě ovlivnění funkcí neutrofilů byl sledován vliv LGR1568 na jejich viabilitu pomocí GIEMSA barvení a světelné mikroskopie. Po 20 hod inkubaci se hladina apoptotických neutrofilů pohybovala kolem 60 %, kdy při rostoucí koncentraci LGR1568 vzrůstala i viabilita neutrofilů až na 80 % při 100 μM (**Obrázek 1F**). Podobně CGS21680, CADO (2-chloroadenosine) a NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosine) prodloužily životnost neutrofilů po 16 h inkubaci, CGS21680 až o 10 h.<sup>366</sup>

Za prodloužením viability neutrofilů by mohla podle literatury stát aktivace adenosinového  $A_{2A}$  receptoru.<sup>353</sup> Za účelem objasnění této hypotézy byla analyzována vazebná afinita LGR1568 k receptorům  $A_1$ ,  $A_{2A}$  a  $A_3$  (provedla skupina doktora Jacobsona KA, USA). Z výsledků plyne, že se LGR1568 váže na všechny testované receptory s afinitou vůči  $A_3$  a  $A_1$  (nM) a v mikromolárních koncentracích k  $A_{2A}$  (**Tabulka 1**). Vzhledem k dominantní expresi  $A_3$  a  $A_{2A}$  neutrofilů a zároveň mikromolárním koncentracím použitým v našich experimentech jsme se zaměřili na možnost zacílení  $A_{2A}$  pomocí LGR1568.<sup>363</sup> Neutrofilů byly ovlivněny komerčním agonistou CGS21680, nespecifickým agonistou CADO a LGR1568 v koncentracích 0,01 až 1  $\mu$ M po dobu 8 h (**Obrázek 2**). Po inkubaci byla analyzována apoptosa neutrofilů pomocí dvojitého barvení Annexinem V a PI a průtokového cytometru. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí koncentrací všech látek se zvyšovala viabilita buněk s přibližně 10% nárůstem při 1  $\mu$ M u všech látek. Při ovlivnění danými látkami a zároveň komerčním antagonistou  $A_{2A}$  ZM241385 došlo k nárůstu počtu apoptotických buněk, a lze tudíž usuzovat, že došlo ke kompetitivní reakci, při které antagonistu vytěsnil testovanou sloučeninu.

Signální kaskáda spuštěná aktivací  $A_{2A}$  receptoru není doposud zcela objasněná. Bylo prokázáno, že agonisté  $A_{2A}$  stimulují činnost proteinfosfatasy 1 $\alpha$ , ovšem další kroky nejsou známy.<sup>367</sup> V této studii navrhuji možný mechanismus, kdy proteinfosfatasa 1 $\alpha$  odstraní fosfát z p47<sup>phox</sup>. Následně dojde k poklesu aktivity NADPH oxidasy, která produkuje méně ROS, sníží se aktivita sfingomyelinasy, což vede k potlačení tvorby ceramidu, inhibici kaspas 3 a 8 a nakonec až k inhibici samotné apoptosy. Pro potvrzení této hypotézy je ovšem nutné mít k dispozici velmi silného agonistu  $A_{2A}$ , a navíc je nezbytné pracovat s dostatkem biologického materiálu, což nebylo za daných podmínek možné.

**Tabulka 1** Vazebné afinity LGR1568 vůči adenosinovým receptorům.

Receptor isotype	$K_i$ (nM)
$A_1$	19.7 $\pm$ 2.6
$A_{2A}$	1050 $\pm$ 210
$A_3$	9.41 $\pm$ 1.2



**Obrázek 2**  $A_{2A}$  antagonist inhibuje antiapoptické účinky LGR1568.

## 8. Závěr

Výstupem této práce bylo několik poznatků týkajících se objasnění mechanismu účinků několika nízkomolekulárních látek. U nově vyvinutých pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů byly na buněčných modelech prokázány protinádorové efekty, které byly podstatně silnější než u mateřského roskovitinu. I když se jedná o panselektivní inhibitory, předpokládáme, že hlavní podíl na aktivitě těchto látek má inhibice CDK2 a CDK7 společně s CDK9 kontrolující transkripci. Další ze série pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů indukovaly apoptosu neutrofilů. Navíc byly schopné překonat i účinky prozánětlivých cytokinů, a mohly by se tudíž stát kandidáty pro další testování. Podobně jako u předchozích sloučenin dochází po aplikaci těchto látek k inhibici transkripčních CDK, které jsou esenciální pro viabilitu neutrofilů. V neposlední řadě byl naznačen mechanismus účinku adenosinového derivátu s antiapoptotickým vlivem na neutrofilů zahrnující aktivaci A<sub>2A</sub> receptoru.

## 9. Reference

- <sup>1</sup>Brown JR, Thornton JL (1957) Percivall Pott (1714-1788) and chimney sweepers' cancer of the scrotum. *Br J Ind Med* **14**, 68-70.
- <sup>2</sup>Sansare K, Khanna V, Karjodkar F (2011) Early victims of X-rays: a tribute and current perception. *Dentomaxillofac Radiol* **40**, 123-5.
- <sup>3</sup>Rous P (1910) A transmissible avian neoplasm. (sarcoma of the common fowl.). *J Exp Med* **12**, 696-705.
- <sup>4</sup>Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- <sup>5</sup>Leitch AE, Riley NA, Sheldrake TA, Festa M, Fox S, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010) The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol* **40**, 1127-38.
- <sup>6</sup>Leitch AE, Lucas CD, Marwick JA, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2012) Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death Differ* **19**, 1950-61.
- <sup>7</sup>Wang K, Hampson P, Hazeldine J, Kryštof V, Strnad M, Pechan P, M J (2012) Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS One* **7**, e30128.
- <sup>8</sup>Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ (2009) Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* **11**, 1275-6.
- <sup>9</sup>Ren S, Rollins BJ (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* **117**, 239-51.
- <sup>10</sup>Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-41.
- <sup>11</sup>Kasten M, Giordano A (2001) Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* **20**, 1832-8.
- <sup>12</sup>Guen VJ, Gamble C, Flajolet M, Unger S, Thollet A, Ferandin Y, Superti-Furga A, Cohen PA, Meijer L, Colas P (2013) CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19525-30.
- <sup>13</sup>Furukawa T, Kanai N, Shiwaku HO, Soga N, Uehara A, Horii A (2006) AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer. *Oncogene* **25**, 4831-9.
- <sup>14</sup>Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J* **21**, 483-92.
- <sup>15</sup>Liu D, Guest S, Finley RL Jr (2010) Why cyclin Y? A highly conserved cyclin with essential functions. *Fly (Austin)* **4**, 278-82.
- <sup>16</sup>Acebron SP, Karaulanov E, Berger BS, Huang YL, Niehrs C (2014) Mitotic wnt signaling promotes protein stabilization and regulates cell size. *Mol Cell* **54**, 663-74.



- <sup>17</sup>Kikuchi K, Niikura Y, Kitagawa K, Kikuchi A (2010) Dishevelled, a Wnt signalling component, is involved in mitotic progression in cooperation with Plk1. *EMBO J* **29**, 3470-83.
- <sup>18</sup>Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H (2001) Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* **3**, 433-8.
- <sup>19</sup>Niehrs C, Acebron SP (2012) Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J* **31**, 2705-13.
- <sup>20</sup>Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ (1994) Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**, 3635-45.
- <sup>21</sup>Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4510-5.
- <sup>22</sup>Yang W, Shen J, Wu M, Arsur M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R, Freedman LP, Sonenshein GE (2001) Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**, 1688-702.
- <sup>23</sup>Coulombe B, Burton ZF (1999) DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 457-78.
- <sup>24</sup>Hsin JP, Manley JL (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**, 2119-37.
- <sup>25</sup>Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM Jr, Dahmus ME (1985) A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7934-8.
- <sup>26</sup>Chapman RD, Heidemann M, Hintermair C, Eick D (2008) Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* **24**, 289-96.
- <sup>27</sup>Liu P, Kenney JM, Stiller JW, Greenleaf AL (2010) Genetic organization, length conservation, and evolution of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Mol Biol Evol* **27**, 2628-41.
- <sup>28</sup>Stellrecht CM, Chen LS (2011) Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer. *Cancers (Basel)* **3**, 4170-90.
- <sup>29</sup>Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**, 2452-60.
- <sup>30</sup>Rodriguez CR, Cho EJ, Keogh MC, Moore CL, Greenleaf AL, Buratowski S (2000) Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**, 104-12.
- <sup>31</sup>Egloff S, Zaborowska J, Laitem C, Kiss T, Murphy S (2012) Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPA2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Mol Cell* **45**, 111-22.

- <sup>32</sup>McCracken S, Fong N, Rosonina E, Yankulov K, Brothers G, Siderovski D, Hessel A, Foster S, Shuman S, Bentley DL (1997) 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* **11**, 3306-18.
- <sup>33</sup>Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J, Handa H (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41-51.
- <sup>34</sup>Sims RJ 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* **18**, 2437-68.
- <sup>35</sup>Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Watanabe D, Handa H (1998) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J* **17**, 7395-403.
- <sup>36</sup>Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H (2006) P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* **21**, 227-37.
- <sup>37</sup>Hsin JP, Sheth A, Manley JL (2011) RNAP II CTD phosphorylated on threonine-4 is required for histone mRNA 3' end processing. *Science* **334**, 683-6.
- <sup>38</sup>Baskaran R, Dahmus ME, Wang JY (1993) Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11167-71.
- <sup>39</sup>Heidemann M, Eick D (2012) Tyrosine-1 and threonine-4 phosphorylation marks complete the RNA polymerase II CTD phospho-code. *RNA Biol* **9**, 1144-6.
- <sup>40</sup>Krishnamurthy S, He X, Reyes-Reyes M, Moore C, Hampsey M (2004) Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* **14**, 387-94.
- <sup>41</sup>Mosley AL, Pattenden SG, Carey M, Venkatesh S, Gilmore JM, Florens L, Workman JL, Washburn MP (2009) Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol Cell* **34**, 168-78.
- <sup>42</sup>Bartkowiak B, Liu P, Phatnani HP, Fuda NJ, Cooper JJ, Price DH, Adelman K, Lis JT, Greenleaf AL (2010) CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev* **24**, 2303-16.
- <sup>43</sup>Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, Cimermanic P, Ule J, Peterlin BM (2011) The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev* **25**, 2158-72.
- <sup>44</sup>Cisek LJ, Corden JL (1989) Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* **339**, 679-84.
- <sup>45</sup>Xu YX, Hirose Y, Zhou XZ, Lu KP, Manley JL (2003) Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev* **17**, 2765-76.

- <sup>46</sup>Rickert P, Seghezzi W, Shanahan F, Cho H, Lees E (1996) Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* **12**, 2631-40.
- <sup>47</sup>Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D (2000) TFIIF is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-6.
- <sup>48</sup>Hu D, Mayeda A, Trembley JH, Lahti JM, Kidd VJ (2003) CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* **278**, 8623-9.
- <sup>49</sup>Larochelle S, Pandur J, Fisher RP, Salz HK, Suter B (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev* **12**, 370-81.
- <sup>50</sup>Wallenfang MR, Seydoux G (2002) cdk-7 Is required for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5527-32.
- <sup>51</sup>Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11173-8.
- <sup>52</sup>Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J (2002) Cyclin-dependent kinase 5 is required for associative learning. *J Neurosci* **22**, 3700-7.
- <sup>53</sup>Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, Yan Z, Sagawa ZK, Ouimet CC, Nairn AC, Nestler EJ, Greengard P (2001) Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* **410**, 376-80.
- <sup>54</sup>Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB (2006) Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 791-6.
- <sup>55</sup>Tsai LH1, Delalle I, Caviness VS Jr, Chae T, Harlow E (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **371**, 419-23.
- <sup>56</sup>Tang D, Yeung J, Lee KY, Matsushita M, Matsui H, Tomizawa K, Hatase O, Wang JH (1995) An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* **270**, 26897-903.
- <sup>57</sup>Wei FY, Tomizawa K, Ohshima T, Asada A, Saito T, Nguyen C, Bibb JA, Ishiguro K, Kulkarni AB, Pant HC, Mikoshiba K, Matsui H, Hisanaga S (2005) Control of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activity by glutamatergic regulation of p35 stability. *J Neurochem* **93**, 502-12.
- <sup>58</sup>Mokalled MH, Johnson A, Kim Y, Oh J, Olson EN (2010) Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* **137**, 2365-74.
- <sup>59</sup>Mikolcevic P, Sigl R, Rauch V, Hess MW, Pfaller K, Barisic M, Pelliniemi LJ, Boesl M, Geley S (2012) Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Mol Cell Biol* **32**, 868-79.
- <sup>60</sup>Shimizu K, Uematsu A, Imai Y, Sawasaki T (2014) Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion. *FEBS Lett* **588**, 3030-7.

- <sup>61</sup>Park MH, Kim SY, Kim YJ, Chung YH (2014) ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochem Biophys Res Commun* **450**, 129-34.
- <sup>62</sup>Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-20.
- <sup>63</sup>Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* **200**, 38-62.
- <sup>64</sup>Poon RY, Lew J, Hunter T (1997) Identification of functional domains in the neuronal Cdk5 activator protein. *J Biol Chem* **272**, 5703-8.
- <sup>65</sup>Zheng M, Leung CL, Liem RK (1998) Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *J Neurobiol* **35**, 141-59.
- <sup>66</sup>Takahashi S, Saito T, Hisanaga S, Pant HC, Kulkarni AB (2003) Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules. *J Biol Chem* **278**, 10506-15.
- <sup>67</sup>Jeong YG, Rosales JL, Marzban H, Sillitoe RV, Park DG, Hawkes R, Lee KY (2003) The cyclin-dependent kinase 5 activator, p39, is expressed in stripes in the mouse cerebellum. *Neuroscience* **118**, 323-34.
- <sup>68</sup>Kamei H, Saito T, Ozawa M, Fujita Y, Asada A, Bibb JA, Saido TC, Sorimachi H, Hisanaga S (2007) Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J Biol Chem* **282**, 1687-94.
- <sup>69</sup>Asada A, Saito T, Hisanaga S (2012) Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner. *J Cell Sci* **125**, 3421-9.
- <sup>70</sup>Patrick GN, Zhou P, Kwon YT, Howley PM, Tsai LH (1998) p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **273**, 24057-64.
- <sup>71</sup>Li S, Song W, Jiang M, Zeng L, Zhu X, Chen J (2014) Phosphorylation of cyclin Y by CDK14 induces its ubiquitination and degradation. *FEBS Lett* **588**, 1989-96.
- <sup>72</sup>Odajima J, Wills ZP, Ndassa YM, Terunuma M, Kretschmannova K, Deeb TZ, Geng Y, Gawrzak S, Quadros IM, Newman J, Das M, Jecrois ME, Yu Q, Li N, Bienvu F, Moss SJ, Greenberg ME, Marto JA, Sicinski P (2011) Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Dev Cell* **21**, 655-68.
- <sup>73</sup>Modi PK, Komaravelli N, Singh N, Sharma P (2012) Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Mol Biol Cell* **23**, 3722-30.

- <sup>74</sup>Brinkkoetter PT, Olivier P, Wu JS, Henderson S, Krofft RD, Pippin JW, Hockenbery D, Roberts JM, Shankland SJ (2009) Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *J Clin Invest* **119**, 3089-101.
- <sup>75</sup>Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D (1991) mik1 and weel cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-22.
- <sup>76</sup>Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG (1995) Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* **6**, 119-34.
- <sup>77</sup>Welburn JP, Tucker JA, Johnson T, Lindert L, Morgan M, Willis A, Noble ME, Endicott JA (2007) How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J Biol Chem* **282**, 3173-81.
- <sup>78</sup>Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler FB, Vidal M, Van Etten RA, Tsai LH (2000) Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* **26**, 633-46.
- <sup>79</sup>Boutros R, Dozier C, Ducommun B (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 185-91.
- <sup>80</sup>Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-7.
- <sup>81</sup>Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* **15**, 2672-81.
- <sup>82</sup>Guan KL, Jenkins CW, Li Y, O'Keefe CL, Noh S, Wu X, Zariwala M, Matera AG, Xiong Y (1996) Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* **7**, 57-70.
- <sup>83</sup>Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G (1995) Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J* **14**, 503-11.
- <sup>84</sup>Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* **14**, 3115-25.
- <sup>85</sup>Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**, 9-22.
- <sup>86</sup>Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* **9**, 639-49.
- <sup>87</sup>Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**, 696-700.
- <sup>88</sup>Porter DC, Zhang N, Danes C, McGahren MJ, Harwell RM, Faruki S, Keyomarsi K (2001) Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* **21**, 6254-69.

- <sup>89</sup>Stirewalt DL, Meshinchi S, Kopecky KJ, Fan W, Pogossova-Agadjanyan EL, Engel JH, Cronk MR, Dorcy KS, McQuary AR, Hockenbery D, Wood B, Heimfeld S, Radich JP (2008) Identification of genes with abnormal expression changes in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 8-20.
- <sup>90</sup>Tommasi S, Giannella C, Mangia A, Primavera A, Paradiso A, Schittulli F (1996) HER-2/neu, c-Myc and cyclin-A in human breast cancer. *Int J Oncol* **9**, 111-5.
- <sup>91</sup>Renshaw AA, Loughlin KR, Dutta A (1998) Cyclin A and MIB1 (Ki67) as markers of proliferative activity in primary renal neoplasms. *Mod Pathol* **11**, 963-6.
- <sup>92</sup>Liu Y, Huang Y, Zhu GZ (2013) Cyclin A1 is a transcriptional target of PITX2 and overexpressed in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Biochem* **384**, 221-7.
- <sup>93</sup>Wang A, Yoshimi N, Ino N, Tanaka T, Mori H (1997) Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* **123**, 124-7.
- <sup>94</sup>Chae SW, Sohn JH, Kim DH, Choi YJ, Park YL, Kim K, Cho YH, Pyo JS, Kim JH (2011) Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. *Yonsei Med J* **52**, 445-53.
- <sup>95</sup>Schauer IE, Siriwardana S, Langan TA, Sclafani RA (1994) Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7827-31.
- <sup>96</sup>Velasco-Velázquez MA, Li Z, Casimiro M, Loro E, Homsí N, Pestell RG (2011) Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol* **7**, 753-65.
- <sup>97</sup>Biliran H Jr, Wang Y, Banerjee S, Xu H, Heng H, Thakur A, Bollig A, Sarkar FH, Liao JD (2005) Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin Cancer Res* **11**, 6075-86.
- <sup>98</sup>Mathew R, Arora S, Khanna R, Shukla NK, Mathur M, Ralhan R (2001) Alterations in cyclin D1 expression in esophageal squamous cell carcinoma in the Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 251-7.
- <sup>99</sup>Lockwood WW, Stack D, Morris T, Grehan D, O'Keane C, Stewart GL, Cumiskey J, Lam WL, Squire JA, Thomas DM, O'Sullivan MJ (2011) Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma. *J Mol Diagn* **13**, 289-96.
- <sup>100</sup>Schildkraut JM, Moorman PG, Bland AE, Halabi S, Calingaert B, Whitaker R, Lee PS, Elkins-Williams T, Bentley RC, Marks JR, Berchuck A (2008) Cyclin E overexpression in epithelial ovarian cancer characterizes an etiologic subgroup. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 585-93.
- <sup>101</sup>Ahn MJ, Kim BH, Jang SJ, Hong EK, Lee WM, Baik HK, Park HK, Lee CB, Ki M. Expression of cyclin D1 and cyclin E in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *J Korean Med Sci* **13**, 513-8.

- <sup>102</sup>Zhao XF, Gartenhaus RB (2009) Phospho-p70S6K and cdc2/cdk1 as therapeutic targets for diffuse large B-cell lymphoma. *Expert Opin Ther Targets* **13**, 1085-93.
- <sup>103</sup>Marone M, Scambia G, Giannitelli C, Ferrandina G, Masciullo V, Bellacosa A, Benedetti-Panici P, Mancuso S (1998) Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression. *Int J Cancer* **75**, 34-9.
- <sup>104</sup>Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Tokuda M (2001) The overexpression of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* **21**, 103-8.
- <sup>105</sup>Zheng D, Cho YY, Lau AT, Zhang J, Ma WY, Bode AM, Dong Z (2008) Cyclin-dependent kinase 3-mediated activating transcription factor 1 phosphorylation enhances cell transformation. *Cancer Res* **68**, 7650-60.
- <sup>106</sup>Cui J, Yang Y, Li H, Leng Y, Qian K, Huang Q, Zhang C, Lu Z, Chen J, Sun T, Wu R, Sun Y, Song H, Wei X, Jing P, Yang X, Zhang C (2015) MiR-873 regulates ER $\alpha$  transcriptional activity and tamoxifen resistance via targeting CDK3 in breast cancer cells. *Oncogene* **34**, 3895-907.
- <sup>107</sup> Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T (1996) Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* **134**, 269-75.
- <sup>108</sup>Lam PY, Di Tomaso E, Ng HK, Pang JC, Roussel MF, Hjelm NM (2000) Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *Br J Neurosurg* **14**, 28-32.
- <sup>109</sup>Yoshida A, Ushiku T, Motoi T, Beppu Y, Fukayama M, Tsuda H, Shibata T (2012) MDM2 and CDK4 immunohistochemical coexpression in high-grade osteosarcoma: correlation with a dedifferentiated subtype. *Am J Surg Pathol* **36**, 423-31.
- <sup>110</sup>Wu A, Wu B, Guo J, Luo W, Wu D, Yang H, Zhen Y, Yu X, Wang H, Zhou Y, Liu Z, Fang W, Yang Z (2011) Elevated expression of CDK4 in lung cancer. *J Transl Med* **9**, 38.
- <sup>111</sup>Strock CJ, Park JI, Nakakura EK, Bova GS, Isaacs JT, Ball DW, Nelkin BD (2006) Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* **66**, 7509-15.
- <sup>112</sup>Eggers JP, Grandgenett PM, Collisson EC, Lewallen ME, Tremayne J, Singh PK, Swanson BJ, Andersen JM, Caffrey TC, High RR, Ouellette M, Hollingsworth MA (2011) Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras. *Clin Cancer Res* **17**, 6140-50.
- <sup>113</sup>Liang Q, Li L, Zhang J, Lei Y, Wang L, Liu DX, Feng J, Hou P, Yao R, Zhang Y, Huang B, Lu J (2013) CDK5 is essential for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Sci Rep* **3**, 2932.
- <sup>114</sup>Chilosi M, Doglioni C, Yan Z, Lestani M, Menestrina F, Sorio C, Benedetti A, Vinante F, Pizzolo G, Inghirami G (1998) Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Am J Pathol* **152**, 209-17.

- <sup>115</sup>Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifenberger G, Korshunov A, Lichter P (2005) Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J Clin Oncol* **23**, 8853-62.
- <sup>116</sup>Wang G, Zheng L, Yu Z, Liao G, Lu L, Xu R, Zhao Z, Chen G (2012) Increased cyclin-dependent kinase 6 expression in bladder cancer. *Oncol Lett* **4**, 43-46.
- <sup>117</sup>Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, Freed E, Ligon AH, Vena N, Ogino S, Chheda MG, Tamayo P, Finn S, Shrestha Y, Boehm JS, Jain S, Bojarski E, Mermel C, Barretina J, Chan JA, Baselga J, Tabernero J, Root DE, Fuchs CS, Loda M, Shivdasani RA, Meyerson M, Hahn WC (2008) CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* **455**, 547-51.
- <sup>118</sup>Duan Z, Zhang J, Choy E, Harmon D, Liu X, Nielsen P, Mankin H, Gray NS, Hornicek FJ (2012) Systematic kinome shRNA screening identifies CDK11 (PITSLRE) kinase expression is critical for osteosarcoma cell growth and proliferation. *Clin Cancer Res* **18**, 4580-8.
- <sup>119</sup>Zhou Y, Han C, Li D, Yu Z, Li F, Li F, An Q, Bai H, Zhang X, Duan Z, Kan Q (2015) Cyclin-dependent kinase 11(p110) (CDK11(p110)) is crucial for human breast cancer cell proliferation and growth. *Sci Rep* **5**, 10433.
- <sup>120</sup>Hye-Eun Kim, Dae-Ghon Kim, Kyung Jin Lee, Jang Geun Son, Min-Young Song, Young-Mi Park, Jae-Jung Kim, Sung-Won Cho, Sung-Gil Chi, Hyun Sub Cheong, Hyoung Doo Shin, Sang-Wook Lee, Jong-Keuk Lee (2012) Frequent Amplification of CENPF, GMNN and CDK13 Genes in Hepatocellular Carcinomas. *PLoS One* **7**, e43223.
- <sup>121</sup>Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T (2010) PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **198**, 118-25.
- <sup>122</sup>Miyagaki H, Yamasaki M, Miyata H, Takahashi T, Kurokawa Y, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Ishii H, Tanaka F, Mori M, Doki Y (2012) Overexpression of PFTK1 predicts resistance to chemotherapy in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **106**, 947-54.
- <sup>123</sup>Cangi MG, Cukor B, Soung P, Signoretti S, Moreira G Jr, Ranashinge M, Cady B, Pagano M, Loda M (2000) Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J Clin Invest* **106**, 753-61.
- <sup>124</sup>Wang Z, Trope CG, Flørenes VA, Suo Z, Nesland JM, Holm R (2010) Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. *BMC Cancer* **10**, 233.
- <sup>125</sup>Xu X, Yamamoto H, Sakon M, Yasui M, Ngan CY, Fukunaga H, Morita T, Ogawa M, Nagano H, Nakamori S, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2003) Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* **9**, 1764-72.
- <sup>126</sup>Khanal P, Yun HJ, Lim SC, Ahn SG, Yoon HE, Kang KW, Hong R, Choi HS (2012) Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 3845-56.



- <sup>127</sup>Yu JH, Zhong XY, Zhang WG, Wang ZD, Dong Q, Tai S, Li H, Cui YF (2012) CDK10 functions as a tumor suppressor gene and regulates survivability of biliary tract cancer cells. *Oncol Rep* **27**, 1266-76.
- <sup>128</sup>Aleem E, Arceci RJ (2015) Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* **3**, 16.
- <sup>129</sup>Le Frère-Belda MA, Cappellen D, Daher A, Gil-Diez-de-Medina S, Besse F, Abbou CC, Thiery JP, Zafrani ES, Chopin DK, Radvanyi F (2001) p15(INK4b) in bladder carcinomas: decreased expression in superficial tumours. *Br J Cancer* **85**, 1515-21.
- <sup>130</sup>Shan M, Zhang X, Liu X, Qin Y, Liu T, Liu Y, Wang J, Zhong Z, Zhang Y, Geng J, Pang D (2013) P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer. *PLoS One* **8**, e76408.
- <sup>131</sup>Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL (2002) Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* **55**, 58-60.
- <sup>132</sup>Hirvikoski P, Kellokoski JK, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Johansson RT, Kosma VM (1999) Downregulation of p21/WAF1 is related to advanced and dedifferentiated laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* **52**, 440-4.
- <sup>133</sup>Nikoleishvili D, Pertia A, Tsintsadze O, Gogokhia N, Chkhotua A (2007) Down-regulation of p27(Kip 1) cyclin-dependent kinase inhibitor in prostate cancer: distinct expression in various prostate cells associating with tumor stage and grades. *Georgian Med News* **143**, 34-8.
- <sup>134</sup>Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T (2005) Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **41**, 105-16.
- <sup>135</sup>Child ES, Hendrychová T, McCague K, Futreal A, Otyepka M, Mann DJ (2010) A cancer-derived mutation in the PSTAIRE helix of cyclin-dependent kinase 2 alters the stability of cyclin binding. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 858-64.
- <sup>136</sup>Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**, 97-9.
- <sup>137</sup>Ekumi KM, Paculova H, Lenasi T, Pospichalova V, Bösken CA, Rybarikova J, Bryja V, Geyer M, Blazek D, Barboric M (2015) Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Res* **43**, 2575-89.
- <sup>138</sup>Kryštof V, Uldrijan S (2010) Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* **11**, 291-302.
- <sup>139</sup>Lapenna S, Giordano A (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 547-66.
- <sup>140</sup>Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, Jatulyte A, Valiunas D, Kaupinis A, Valius M (2014) Highlights of the Latest Advances in Research on CDK Inhibitors. *Cancers (Basel)* **6**, 2224-42.

- <sup>141</sup>Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, Takahashi Y, Masuma R (1977) A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 275-82.
- <sup>142</sup>Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **135**, 397-402.
- <sup>143</sup>Crissman HA, Gadbois DM, Tobey RA, Bradbury EM (1991) Transformed mammalian cells are deficient in kinase-mediated control of progression through the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7580-4.
- <sup>144</sup>Gadbois DM, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM (1992) Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 80-5.
- <sup>145</sup>Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, Matsumoto H, Suzuki-Takahashi I, Kokubo T, Higashi H, Saitoh S, Taya Y, Yasuda H, et al (1993) Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **8**, 2425-32.
- <sup>146</sup>Nishio K, Ishida T, Arioka H, Kurokawa H, Fukuoka K, Nomoto T, Fukumoto H, Yokote H, Saijo N (1996) Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res* **16**, 3387-95.
- <sup>147</sup>Wada M, Hosotani R, Lee JU, Doi R, Koshiha T, Fujimoto K, Miyamoto Y, Tsuji S, Nakajima S, Okuyama A, Imamura M (1998) An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* **18**, 2559-66.
- <sup>148</sup>Dayton PK, Robilliard GA, Paine RT, Dayton LB (1974) Biological accomodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antartica. *Ecological Monographs* **44**, 105-28.
- <sup>149</sup>Perry NB, Ettouati L, Litaudon M, Blunt JW, Munro MHG (1994) Alkaloids from the antartic sponge *Kirkpatrickia varialosa*. Part 1: Variolin B, a new antitumour and antiviral compound. *Tetrahedron* **50**, 3987-3992.
- <sup>150</sup>Simone M, Erba E, Damia G, Vikhanskaya F, Di Francesco AM, Riccardi R, Bailly C, Cuevas C, Fernandez Sousa-Faro JM, D'Incalci M (2005) Variolin B and its derivate deoxy-variolin B: new marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. *Eur J Cancer* **41**, 2366-77.
- <sup>151</sup>Gompel M, Leost M, De Kier Joffe EB, Puricelli L, Franco LH, Palermo J, Meijer L (2004) Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian *Aplidium meridianum*. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 1703-7.
- <sup>152</sup>Bettayeb K, Tirado OM, Marionneau-Lambot S, Ferandin Y, Lozach O, Morris JC, Mateo-Lozano S, Drueckes P, Schächtele C, Kubbutat MH, Liger F, Marquet B, Joseph B, Echalié A, Endicott JA, Notario V, Meijer L (2007) Meriolins, a new class of cell death inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* **67**, 8325-34.

- <sup>153</sup>Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* **1**, 60-7.
- <sup>154</sup>Lane ME, Yu B, Rice A, Lipson KE, Liang C, Sun L, Tang C, McMahon G, Pestell RG, Wadler S (2001) A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res* **61**, 6170-7.
- <sup>155</sup>Moshinsky DJ, Bellamacina CR, Boisvert DC, Huang P, Hui T, Jancarik J, Kim SH, Rice AG (2003) SU9516: biochemical analysis of cdk inhibition and crystal structure in complex with cdk2. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 1026-31.
- <sup>156</sup>Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224**, 771-86.
- <sup>157</sup>Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* **243**, 527-36.
- <sup>158</sup>Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C (2007) A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer* **96**, 29-37.
- <sup>159</sup>Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E (1992) Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* **84**, 1736-40.
- <sup>160</sup>Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ (1994) Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 589-95.
- <sup>161</sup>Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ (1996) Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **56**, 2973-8.
- <sup>162</sup>Patel V, Senderowicz AM, Pinto D Jr, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind JS (1998) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest* **102**, 1674-81.
- <sup>163</sup>Arguello F, Alexander M, Sterry JA, Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF Jr, Koss W, Morgan CD, Stinson SF, Siford TJ, Alvord WG, Klabansky RL, Sausville EA (1998) Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity In vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* **91**, 2482-90.
- <sup>164</sup>Motwani M, Rizzo C, Sirotak F, She Y, Schwartz GK (2003) Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2**, 549-55.

- <sup>165</sup>Raju U, Nakata E, Mason KA, Ang KK, Milas L (2003) Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **63**, 3263-7.
- <sup>166</sup>Jung C, Motwani M, Kortmanský J, Sirotnak FM, She Y, Gonen M, Haimovitz-Friedman A, Schwartz GK (2003) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates gamma-irradiation-induced apoptosis in colon and gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**, 6052-61.
- <sup>167</sup>Camphausen K, Brady KJ, Burgan WE, Cerra MA, Russell JS, Bull EE, Tofilon PJ (2004) Flavopiridol enhances human tumor cell radiosensitivity and prolongs expression of gammaH2AX foci. *Mol Cancer Ther* **3**, 409-16.
- <sup>168</sup>Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, Hill K, Steinberg SM, Figg WD, Tompkins A, Arbuck SG, Sausville EA (1998) Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* **16**, 2986-99.
- <sup>169</sup>Rudek MA, Bauer KS Jr, Lush RM 3rd, Stinson SF, Senderowicz AM, Headlee DJ, Arbuck SG, Cox MC, Murgo AJ, Sausville EA, Figg WD (2003) Clinical pharmacology of flavopiridol following a 72-hour continuous infusion. *Ann Pharmacother* **37**, 1369-74.
- <sup>170</sup>Stadler WM, Vogelzang NJ, Amato R, Sosman J, Taber D, Liebowitz D, Vokes EE (2000) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in metastatic renal cancer: a University of Chicago Phase II Consortium study. *J Clin Oncol* **18**, 371-5.
- <sup>171</sup>Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, Werner J, Perkins P, Stoltz M, Kelsen D (2001) Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* **19**, 1985-92.
- <sup>172</sup>Shapiro GI, Supko JG, Patterson A, Lynch C, Lucca J, Zaccarola PF, Muzikansky A, Wright JJ, Lynch TJ Jr, Rollins BJ (2001) A phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 1590-9.
- <sup>173</sup>D'Amato G, Rocha Lima C, Mahany JJ, Muro-Cacho C, Haura EB (2004) Neutropenic enterocolitis (typhilitis) associated with docetaxel therapy in a patient with non-small-cell lung cancer: case report and review of literature. *Lung Cancer* **44**, 381-90.
- <sup>174</sup>Tan AR, Yang X, Berman A, Zhai S, Sparreboom A, Parr AL, Chow C, Brahim JS, Steinberg SM, Figg WD, Swain SM (2004) Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with docetaxel in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 5038-47.
- <sup>175</sup>Chao SH, Fujinaga K, Marion JE, Taube R, Sausville EA, Senderowicz AM, Peterlin BM, Price DH (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* **275**, 28345-8.
- <sup>176</sup>Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W (2005) Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* **106**, 2513-9.
- <sup>177</sup>Wang D, de la Fuente C, Deng L, Wang L, Zilberman I, Eadie C, Healey M, Stein D, Denny T, Harrison LE, Meijer L, Kashanchi F (2001) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Virol* **75**, 7266-79.

- <sup>178</sup>MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Lane DP, Green SR (2005) Seliciclib (CYC202, R-Roscovitrine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* **65**, 5399-407.
- <sup>179</sup>Raje N, Kumar S, Hideshima T, Rocco A, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraiishi N, Chauhan D, Munshi NC, Green SR, Anderson KC (2005) Seliciclib (CYC202 or R-roscovitrine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* **106**, 1042-7.
- <sup>180</sup>Lacrima K, Valentini A, Lambertini C, Tadorelli M, Rinaldi A, Zucca E, Catapano C, Cavalli F, Gianella-Borradori A, Maccallum DE, Bertoni F (2005) In vitro activity of cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Seliciclib, R-roscovitrine) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* **16**, 1169-76.
- <sup>181</sup>Alvi AJ, Austen B, Weston VJ, Fegan C, MacCallum D, Gianella-Borradori A, Lane DP, Hubank M, Powell JE, Wei W, Taylor AM, Moss PA, Stankovic T (2005) A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitrine), overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood* **105**, 4484-91.
- <sup>182</sup>Demidenko ZN, Blagosklonny MV (2004) Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res* **64**, 3653-60.
- <sup>183</sup>Lu W, Chen L, Peng Y, Chen J (2001) Activation of p53 by roscovitrine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene* **20**, 3206-16.
- <sup>184</sup>Melillo G, Sausville EA, Cloud K, Lahusen T, Varesio L, Senderowicz AM (1999) Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res* **59**, 5433-7.
- <sup>185</sup>Jorda R, Paruch K, Kryštof V (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitrine: purine bioisosteres. *Curr Pharm Des* **18**, 2974-80.
- <sup>186</sup>Kryštof V, McNae IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Müller P, Vojtěšek B, Orság M, Havlíček L, Strnad M (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1763-71.
- <sup>187</sup>Brooks EE, Gray NS, Joly A, Kerwar SS, Lum R, Mackman RL, Norman TC, Rosete J, Rowe M, Schow SR, Schultz PG, Wang X, Wick MM, Shiffman D (1997) CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem* **272**, 29207-11.
- <sup>188</sup>Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (2008) CR8, a potent and selective, roscovitrine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**, 5797-807.
- <sup>189</sup>Moravcová D, Kryštof V, Havlíček L, Moravec J, Lenobel R, Strnad M (2003) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2989-92.

- <sup>190</sup>Paruch K, Dwyer MP, Alvarez C, Brown C, Chan TY, Doll RJ, Keertikar K, Knutson C, McKittrick B, Rivera J, Rossman R, Tucker G, Fischmann TO, Hruza A, Madison V, Nomeir AA, Wang Y, Lees E, Parry D, Sgambellone N, Seghezzi W, Schultz L, Shanahan F, Wiswell D, Xu X, Zhou Q, James RA, Paradkar VM, Park H, Rokosz LR, Stauffer TM, Guzi TJ (2007) Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 6220-3.
- <sup>191</sup>Popowycz F, Fournet G, Schneider C, Bettayeb K, Ferandin Y, Lamigeon C, Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V, Colas P, Bernard P, Meijer L, Joseph B (2009) Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *J Med Chem* **52**, 655-63.
- <sup>192</sup>Sroka IM, Heiss EH, Havlíček L, Totzke F, Aristei Y, Pechan P, Kubbutat MH, Strnad M, Dirsch VM (2010) A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **77**, 255-61.
- <sup>193</sup>Kryštof V, Moravcová D, Paprskářová M, Barbier P, Peyrot V, Hlobilková A, Havlíček L, Strnad M (2006) Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-d]pyrimidine analogues of myoseverin. *Eur J Med Chem* **41**, 1405-11.
- <sup>194</sup>Vymětalová L, Havlíček L, Šturc A, Skrášková Z, Jorda R, Pospíšil T, Strnad M, Kryštof V (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **110**, 291-301.
- <sup>195</sup>Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM (2010) Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **9**, 2344-53.
- <sup>196</sup>Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, Nishimura EK, Golub TR, Fisher DE (2004) Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **6**, 565-76.
- <sup>197</sup>Davies TG, Pratt DJ, Endicott JA, Johnson LN, Noble ME (2002) Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacol Ther* **93**, 125-33.
- <sup>198</sup>Kryštof V, Chamrád I, Jorda R, Kohoutek J (2010) Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Med Res Rev* **30**, 646-66.
- <sup>199</sup>Ali S, Heathcote DA, Kroll SH, Jogalekar AS, Scheiper B, Patel H, Brackow J, Siwicka A, Fuchter MJ, Periyasamy M, Tolhurst RS, Kanneganti SK, Snyder JP, Liotta DC, Aboagye EO, Barrett AG, Coombes RC (2009) The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Res* **69**, 6208-15.
- <sup>200</sup>Heuer T.S. (October 21-24, 2008) Discovery of selective CDK9 small molecule inhibitors: CDK9 inhibition in tumor cells is associated with inhibition of proliferation and induction of apoptosis. AACR-

NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets, Cancer Therapeutics, Discovery, Biology and Clinical Applications. Geneva, Switzerland.

- <sup>201</sup>Albert TK, Rigault C, Eickhoff J, Baumgart K, Antrecht C, Klebl B, Mittler G, Meisterernst M (2014) Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor. *Br J Pharmacol* **171**, 55-68.
- <sup>202</sup>Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* **35**, 25-31.
- <sup>203</sup>Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* **22**, 44-52.
- <sup>204</sup>Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.
- <sup>205</sup>Moons DS, Jirawatnotai S, Tsutsui T, Franks R, Parlow AF, Hales DB, Gibori G, Fazleabas AT, Kiyokawa H (2000) Intact follicular maturation and defective luteal function in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* **143**, 647-54.
- <sup>206</sup>Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M, Hoppa MB, Syyed F, van de Laar L, Gunter JH, de Koning EJ, Walls GV, Gray DW, Johnson PR, Hansen BC, Morris JF, Pipeleers-Marichal M, Cnop I, Clark A (2010) The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* **53**, 321-30.
- <sup>207</sup>Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-14.
- <sup>208</sup>Leonard JP, LaCasce AS, Smith MR, Noy A, Chirieac LR, Rodig SJ, Yu JQ, Vallabhajosula S, Schoder H, English P, Neuberger DS, Martin P, Millenson MM, Ely SA, Courtney R, Shaik N, Wilner KD, Randolph S, Van den Abbeele AD, Chen-Kiang SY, Yap JT, Shapiro GI (2012) Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* **119**, 4597-607.
- <sup>209</sup>Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P (2005) Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* **7**, 831-6.
- <sup>210</sup>Cai D, Latham VM Jr, Zhang X, Shapiro GI (2006) Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* **66**, 9270-80.
- <sup>211</sup>Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811-5.
- <sup>212</sup>Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Bréchet C, Sobczak-Thépot J (1997) Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* **15**, 83-6.

- <sup>213</sup>Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T (1998) Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4344-9.
- <sup>214</sup>Li T, Inoue A, Lahti JM, Kidd VJ (2004) Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development. *Mol Cell Biol* **24**, 3188-97.
- <sup>215</sup>Ganuzza M, Sáiz-Ladera C, Cañamero M, Gómez G, Schneider R, Blasco MA, Pisano D, Paramio JM, Santamaría D, Barbacid M (2012) Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *EMBO J* **31**, 2498-510.
- <sup>216</sup>Cisek LJ, Corden JL (1989) Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* **339**, 679-84.
- <sup>217</sup>Deng L, Ammosova T, Pumfery A, Kashanchi F, Nekhai S (2002) HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter. *J Biol Chem* **277**, 33922-9.
- <sup>218</sup>Lagace DC, Benavides DR, Kansy JW, Mapelli M, Greengard P, Bibb JA, Eisch AJ (2008) Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18567-71.
- <sup>219</sup>Kaelin WG Jr (2005) The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **5**, 689-98.
- <sup>220</sup>Muller PY, Milton MN (2012) The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 751-61.
- <sup>221</sup>Bridges CB (1922) The origin and variation in sexual and sex-linked characters. *Am Nat* **56**, 51-63.
- <sup>222</sup>Dobzhansky T (1946) Genetics of Natural Populations. Xiii. Recombination and Variability in Populations of *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* **31**, 269-90.
- <sup>223</sup>Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-6.
- <sup>224</sup>Ooi SL, Shoemaker DD, Boeke JD (2003) DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* **35**, 277-86.
- <sup>225</sup>Gitlin L, Karelsky S, Andino R (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**, 430-4.
- <sup>226</sup>Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-58.



- <sup>227</sup>Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH (1997) Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* **278**, 1064-8.
- <sup>228</sup>Feng Z, Scott SP, Bussen W, Sharma GG, Guo G, Pandita TK, Powell SN (2011) Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 686-91.
- <sup>229</sup>Wang Y, Engels IH, Knee DA, Nasoff M, Deveraux QL, Quon KC (2004) Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. *Cancer Cell* **5**, 501-12.
- <sup>230</sup>Vymětalová L, Kryštof V (2015) Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Med Res Rev* **35**, 1156-74.
- <sup>231</sup>Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK (1999) Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **5**, 1876-83.
- <sup>232</sup>Motwani M, Jung C, Sirotiak FM, She Y, Shah MA, Gonen M, Schwartz GK (2001) Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts. *Clin Cancer Res* **7**, 4209-19.
- <sup>233</sup>Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A (2008) A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* **27**, 1368-77.
- <sup>234</sup>Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM (2014) Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Biol Chem* **289**, 9247-53.
- <sup>235</sup>Shen C, Kaelin WG Jr (2013) The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* **23**, 18-25.
- <sup>236</sup>Bommi-Reddy A, Almeciga I, Sawyer J, Geisen C, Li W, Harlow E, Kaelin WG Jr, Grueneberg DA (2008) Kinase requirements in human cells: III. Altered kinase requirements in VHL-/- cancer cells detected in a pilot synthetic lethal screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16484-9.
- <sup>237</sup>Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaría D, Barbacid M (2010) A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* **18**, 63-73.
- <sup>238</sup>Liu Y, Zhu YH, Mao CQ, Dou S, Shen S, Tan ZB, Wang J (2014) Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. *J Control Release* **192**, 114-21.
- <sup>239</sup>Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, Gonzalez-Angulo AM, Creasman KJ, Bazarov AV, Smyth JW, Davis SE, Yaswen P, Mills GB, Esserman LJ, Goga A (2012) MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med* **209**, 679-96.
- <sup>240</sup>Goga A, Yang D, Tward AD, Morgan DO, Bishop JM (2007) Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat Med* **13**, 820-7.

- <sup>241</sup>Barrett RM, Osborne TP, Wheatley SP (2009) Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle* **8**, 278-83.
- <sup>242</sup>Molenaar JJ, Ebus ME, Geerts D, Koster J, Lamers F, Valentijn LJ, Westerhout EM, Versteeg R, Caron HN (2009) Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12968-73.
- <sup>243</sup>Huang CH, Lujambio A, Zuber J, Tschaharganeh DF, Doran MG, Evans MJ, Kitzing T, Zhu N, de Stanchina E, Sawyers CL, Armstrong SA, Lewis JS, Sherr CJ, Lowe SW (2014) CDK9-mediated transcription elongation is required for MYC addiction in hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* **28**, 1800-14.
- <sup>244</sup>Cheng CK, Gustafson WC, Charron E, Houseman BT, Zunder E, Goga A, Gray NS, Pollok B, Oakes SA, James CD, Shokat KM, Weiss WA, Fan QW (2012) Dual blockade of lipid and cyclin-dependent kinases induces synthetic lethality in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12722-7.
- <sup>245</sup>Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3516-20.
- <sup>246</sup>Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 83-94.
- <sup>247</sup>Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ (2000) MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* **275**, 25255-61.
- <sup>248</sup>Kim JH, Sim SH, Ha HJ, Ko JJ, Lee K, Bae J (2009) MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Lett* **583**, 2758-64.
- <sup>249</sup>Stewart DP, Koss B, Bathina M, Perciavalle RM, Bisanz K, Opferman JT (2010) Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol* **30**, 3099-110.
- <sup>250</sup>Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H (2002) Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**, 43730-4.
- <sup>251</sup>Ding Q, He X, Hsu JM, Xia W, Chen CT, Li LY, Lee DF, Liu JC, Zhong Q, Wang X, Hung MC (2007) Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* **27**, 4006-17.
- <sup>252</sup>Ding Q, Huo L, Yang JY, Xia W, Wei Y, Liao Y, Chang CJ, Yang Y, Lai CC, Lee DF, Yen CJ, Chen YJ, Hsu JM, Kuo HP, Lin CY, Tsai FJ, Li LY, Tsai CH, Hung MC (2008) Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 6109-17.
- <sup>253</sup>Warr MR, Acoca S, Liu Z, Germain M, Watson M, Blanchette M, Wing SS, Shore GC (2005) BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett* **579**, 5603-8.

- <sup>254</sup>Warr MR, Acoca S, Liu Z, Germain M, Watson M, Blanchette M, Wing SS, Shore GC (2005) BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett* **579**, 5603-8.
- <sup>255</sup>Shimazu T, Degenhardt K, Nur-E-Kamal A, Zhang J, Yoshida T, Zhang Y, Mathew R, White E, Inouye M (2007) NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev* **21**, 929-41.
- <sup>256</sup>Clohessy JG, Zhuang J, de Boer J, Gil-Gómez G, Brady HJ (2006) Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome *c* release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 5750-9.
- <sup>257</sup>Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**, 1294-305.
- <sup>258</sup>Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, Mouzakiti A, Habens F, Brimmell M, Zhang KY, Craig RW, Marcusson EG, Johnson PW, Packham G (2004) Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* **23**, 4818-27.
- <sup>259</sup>Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **275**, 39458-65.
- <sup>260</sup>Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V (2005) A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* **387**, 659-67.
- <sup>261</sup>Jamil S, Mojtabavi S, Hojabrpour P, Cheah S, Duronio V (2008) An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **19**, 3212-20.
- <sup>262</sup>Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ (2000) Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* **14**, 23-7.
- <sup>263</sup>Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ (2003) Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671-6.
- <sup>264</sup>Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ (2005) Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* **307**, 1101-4.
- <sup>265</sup>Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, Skvara H, Florian S, Sonneck K, Akgul C, Derdak S, Pickl WF, Wacheck V, Selzer E, Monia BP, Moriggl R, Valent P, Sillaber C (2005) Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* **105**, 3303-11.
- <sup>266</sup>Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, Oyarzo M, Ramalingam P, Paraguya A, McDonnell TJ, Amin HM, Medeiros LJ (2004) MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* **35**, 1095-100.
- <sup>267</sup>Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. *Blood* **91**, 3379-89.

- <sup>268</sup>Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, McDonnell TJ, Abruzzo LV, Lai R (2003) Expression of Mcl-1 in mantle cell lymphoma is associated with high-grade morphology, a high proliferative state, and p53 overexpression. *J Pathol* **199**, 90-7.
- <sup>269</sup>Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Amiot M, Bataille R (2005) Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* **19**, 1248-52.
- <sup>270</sup>Sieghart W, Losert D, Strommer S, Cejka D, Schmid K, Rasoul-Rockenschaub S, Bodingbauer M, Crevenna R, Monia BP, Peck-Radosavljevic M, Wacheck V (2006) Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* **44**, 151-7.
- <sup>271</sup>Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshiha T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Kato M, Shimada Y, Imamura M (1999) Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology* **56**, 73-82.
- <sup>272</sup>Sano M, Nakanishi Y, Yagasaki H, Honma T, Oinuma T, Obana Y, Suzuki A, Nemoto N (2005) Overexpression of anti-apoptotic Mcl-1 in testicular germ cell tumours. *Histopathology* **46**, 532-9.
- <sup>273</sup>Chung TK, Cheung TH, Lo WK, Yim SF, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF (2002) Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett* **180**, 63-8.
- <sup>274</sup>Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P (2007) Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol* **20**, 416-26.
- <sup>275</sup>Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB (2005) Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* **4**, 267-76.
- <sup>276</sup>Craig RW (2002) MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* **16**, 444-54.
- <sup>277</sup>Puthier D, Bataille R, Amiot M (1999) IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* **29**, 3945-50.
- <sup>278</sup>Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores GJ (2005) Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **42**, 1329-38.
- <sup>279</sup>Liu H, Ma Y, Cole SM, Zander C, Chen KH, Karras J, Pope RM (2003) Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* **102**, 344-52.
- <sup>280</sup>Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF (1999) The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* **19**, 6195-206.
- <sup>281</sup>Wang JM, Lai MZ, Yang-Yen HF (2003) Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol Cell Biol* **23**, 1896-909.

- <sup>282</sup>Bettayeb K, Baunbæk D, Delehouze C, Loaëc N, Hole AJ, Baumli S, Endicott JA, Douc-Rasy S, Bénard J, Oumata N, Galons H, Meijer L (2010) CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes Cancer* **1**, 369-80.
- <sup>283</sup>Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-81.
- <sup>284</sup>Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* **25**, 101-37.
- <sup>285</sup>Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**, 500-10.
- <sup>286</sup>Opferman JT (2007) Life and death during hematopoietic differentiation. *Curr Opin Immunol* **19**, 497-502.
- <sup>287</sup>Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657-70.
- <sup>288</sup>Simon SI, Cherapanov V, Nadra I, Waddell TK, Seo SM, Wang Q, Doerschuk CM, Downey GP (1999) Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. *J Immunol* **163**, 2891-901.
- <sup>289</sup>McEver RP, Cummings RD (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* **100**(11 Suppl), S97-103.
- <sup>290</sup>Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, Coggeshall KM, McEver RP (2010) E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood* **116**, 485-94.
- <sup>291</sup>Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, Ley K, Zarbock A (2010) Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood* **115**, 3118-27.
- <sup>292</sup>Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-89.
- <sup>293</sup>Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* **28**, 340-5.
- <sup>294</sup>Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A (1996) Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**, 288-95.
- <sup>295</sup>Singer II, Scott S, Kawka DW, Kazazis DM (1989) Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Cell Biol* **109**, 3169-82.
- <sup>296</sup>Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**, 1317-27.

- <sup>297</sup>Jesaitis AJ, Buescher ES, Harrison D, Quinn MT, Parkos CA, Livesey S, Linner J (1990) Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J Clin Invest* **85**, 821-35.
- <sup>298</sup>Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* **30**, 459-89.
- <sup>299</sup>Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**, 278-86.
- <sup>300</sup>Kobayashi SD, Voyich JM, Somerville GA, Braughton KR, Malech HL, Musser JM, DeLeo FR (2003) An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **73**, 315-22.
- <sup>301</sup>Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-5.
- <sup>302</sup>Weigert A, Jennewein C, Brüne B (2009) The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. *Biol Chem* **390**, 379-90.
- <sup>303</sup>Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008748.
- <sup>304</sup>Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**, 26159-65.
- <sup>305</sup>Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL (2000) Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* **275**, 23065-73.
- <sup>306</sup>Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* **447**, 869-74.
- <sup>307</sup>Godson C, Brady HR (2000) Lipoxins: novel anti-inflammatory therapeutics? *Curr Opin Investig Drugs* **1**, 380-5.
- <sup>308</sup>Dringenberg C, Apenberg S, Andrassy K (1993) p-ANCA with myeloperoxidase antibodies and c-ANCA with proteinase 3 antibodies define a different vasculitis entity in patients with renal involvement. *Adv Exp Med Biol* **336**, 445-7.
- <sup>309</sup>Németh T, Mócsai A (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* **143**, 9-19.
- <sup>310</sup>Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, Meller S, Chamilos G, Sebasigari R, Riccieri V, Bassett R, Amuro H, Fukuhara S, Ito T, Liu YJ, Gilliet M (2011) Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra19.

- <sup>311</sup>Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V (2011) Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* **3**, 73ra20.
- <sup>312</sup>Gammon WR, Briggaman RA (1993) Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. Diseases of autoimmunity to type VII collagen. *Dermatol Clin* **11**, 535-47.
- <sup>313</sup>Chiriac MT, Roesler J, Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K, Zillikens D, Sitaru C (2007) NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage. *J Pathol* **212**, 56-65.
- <sup>314</sup>Mewar D, Wilson AG (2006) Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* **60**, 648-55.
- <sup>315</sup>Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD (2006) A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med* **203**, 829-35.
- <sup>316</sup>Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M (1991) Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **87**, 463-9.
- <sup>317</sup>Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW (2002) Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines. *Ann Rheum Dis* **61**, 13-9.
- <sup>318</sup>Youssef PP, Cormack J, Evill CA, Peter DT, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ, Smith MD (1996) Neutrophil trafficking into inflamed joints in patients with rheumatoid arthritis, and the effects of methylprednisolone. *Arthritis Rheum* **39**, 216-25.
- <sup>319</sup>Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH (2001) Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **60**, 729-35.
- <sup>320</sup>Malemud CJ, Pearlman E (2009) Targeting JAK/STAT signaling pathway in inflammatory diseases. *Curr Signal Transduct Ther* **4**, 201-221.
- <sup>321</sup>Seavey MM, Dobrzanski P (2012) The many faces of Janus kinase. *Biochem Pharmacol* **83**, 1136-45.
- <sup>322</sup>Malemud CJ, Blumenthal DE (2014) Protein kinase small molecule inhibitors for rheumatoid arthritis: Medicinal chemistry/clinical perspectives. *World J Orthop* **5**, 496-503.
- <sup>323</sup>Mesa RA (2010) Ruxolitinib, a selective JAK1 and JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis. *IDrugs* **13**, 394-403.
- <sup>324</sup>Goldstein DM, Kuglstatler A, Lou Y, Soth MJ (2010) Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *J Med Chem* **53**, 2345-53.
- <sup>325</sup>Genovese MC, Cohen SB, Wofsy D, Weinblatt ME, Firestein GS, Brahn E, Strand V, Baker DG, Tong SE (2011) A 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study of the efficacy of oral SCIO-469, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **38**, 846-54.

- <sup>326</sup>Cohen SB, Cheng TT, Chindalore V, Damjanov N, Burgos-Vargas R, Delora P, Zimany K, Travers H, Caulfield JP (2009) Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 335-44.
- <sup>327</sup>Damjanov N, Kauffman RS, Spencer-Green GT (2009) Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum* **60**, 1232-41.
- <sup>328</sup>Nijjar JS, Tindell A, McInnes IB, Siebert S (2013) Inhibition of spleen tyrosine kinase in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **52**, 1556-62.
- <sup>329</sup>Leitch AE, Haslett C, Rossi AG (2009) Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and pro-resolution agents. *Br J Pharmacol* **158**, 1004-16.
- <sup>330</sup>Ren Y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W, Tam PK, Savill J (2008) Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* **180**, 4978-85.
- <sup>331</sup>Scheel-Toellner D, Wang K, Assi LK, Webb PR, Craddock RM, Salmon M, Lord JM (2004) Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Soc Trans* **32**, 679-81.
- <sup>332</sup>Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* **68**, 158-66.
- <sup>333</sup>Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW (1998) Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* **92**, 2495-502.
- <sup>334</sup>Klausen P, Bjerregaard MD, Borregaard N, Cowland JB (2004) End-stage differentiation of neutrophil granulocytes *in vivo* is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. *J Leukoc Biol* **75**, 569-78.
- <sup>335</sup>Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, Martinez-Losa M, Walker TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin MC, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med* **12**, 1056-64.
- <sup>336</sup>Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Häcker H, Paul R, Häcker G (2009) Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog* **5**, e1000461.
- <sup>337</sup>Moriceau S, Lenoir G, Witko-Sarsat V (2010) In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance. *J Innate Immun* **2**, 260-6.
- <sup>338</sup>Afford SC, Pongracz J, Stockley RA, Crocker J, Burnett D (1992) The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J Biol Chem* **267**, 21612-6.
- <sup>339</sup>Gyllenhammar H (1987) Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* **97**, 209-13.



- <sup>340</sup>Luu NT, Madden J, Calder PC, Grimble RF, Shearman CP, Chan T, Tull SP, Dastur N, Rainger GE, Nash GB (2007) Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an in vitro culture model. *Atherosclerosis* **193**, 259-68.
- <sup>341</sup>Jorda R, Havlíček L, McNae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Štunc A, Navrátilová J, Kuzma M, Mistrík M, Bártek J, Strnad M, Kryštof V (2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem* **54**, 2980-93.
- <sup>342</sup>Řezníčková E, Weitensteiner S, Havlíček L, Jorda R, Gucký T, Berka K, Bazgier V, Zahler S, Kryštof V, Strnad M (2015) Characterization of a Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases 2 and 5 and Aurora A With Pro-Apoptotic and Anti-Angiogenic Activity In Vitro. *Chem Biol Drug Des* **86**, 1528-40.
- <sup>343</sup>Gucký T, Jorda R, Zatloukal M, Bazgier V, Berka K, Řezníčková E, Béres T, Strnad M, Kryštof V (2013) A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Med Chem* **56**, 6234-47.
- <sup>344</sup>Trova MP, Barnes KD, Barford C, Benanti T, Bielaska M, Burry L, Lehman JM, Murphy C, O'Grady H, Peace D, Salamone S, Smith J, Snider P, Toporowski J, Tregay S, Wilson A, Wyle M, Zheng X, Friedrich TD (2009) Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 6608-12.
- <sup>345</sup>Trova MP, Barnes KD, Alicea L, Benanti T, Bielaska M, Bilotta J, Bliss B, Duong TN, Haydar S, Herr RJ, Hui Y, Johnson M, Lehman JM, Peace D, Rainka M, Snider P, Salamone S, Tregay S, Zheng X, Friedrich TD (2009) Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 6613-7.
- <sup>346</sup>Havlíček L, Hanus J, Veselý J, Leclerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* **40**, 408-12.
- <sup>347</sup>Chang YT, Gray NS, Rosania GR, Sutherlin DP, Kwon S, Norman TC, Sarohia R, Leost M, Meijer L, Schultz PG (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol* **6**, 361-75.
- <sup>348</sup>Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard ML, Myriantopoulos V, Mikros E, Flajolet M, Greengard P, Meijer L, Galons H (2008) Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J Med Chem* **51**, 5229-42.
- <sup>349</sup>Rea K, Sensi M, Anichini A, Canevari S, Tomassetti A (2013) EGFR/MEK/ERK/CDK5-dependent integrin-independent FAK phosphorylated on serine 732 contributes to microtubule depolymerization and mitosis in tumor cells. *Cell Death Dis* **4**, e815.
- <sup>350</sup>Haskó G, Cronstein B (2013) Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol* **4**, 85.
- <sup>351</sup>Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 673-94.

- <sup>352</sup>Linden J (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 775-87.
- <sup>353</sup>Barletta KE, Ley K, Mehrad B (2012) Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 856-64.
- <sup>354</sup>Sottofattori E, Anzaldi M, Ottonello L (2001) HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J Pharm Biomed Anal* **24**, 1143-6.
- <sup>355</sup>Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R (1983) Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* **158**, 1160-77.
- <sup>356</sup>Möser GH, Schrader J, Deussen A (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* **256**, C799-806.
- <sup>357</sup>Cerqueira MD, Verani MS, Schwaiger M, Heo J, Iskandrian AS (1994) Safety profile of adenosine stress perfusion imaging: results from the Adenoscan Multicenter Trial Registry. *J Am Coll Cardiol* **23**, 384-9.
- <sup>358</sup>Mazzon E, Esposito E, Impellizzeri D, Di Paola R, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S (2011) CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J Rheumatol* **38**, 2119-29.
- <sup>359</sup>Chen CM, Penuelas O, Quinn K, Cheng KC, Li CF, Zhang H, Slutsky AS (2009) Protective effects of adenosine A2A receptor agonist in ventilator-induced lung injury in rats. *Crit Care Med* **37**, 2235-41.
- <sup>360</sup>Impellizzeri D, Di Paola R, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Melani A, Bramanti P, Pedata F, Cuzzocrea S (2011) CGS 21680, an agonist of the adenosine (A2A) receptor, decreases acute lung inflammation. *Eur J Pharmacol* **668**, 305-16.
- <sup>361</sup>Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, Cherezov V, Stevens RC (2011) Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* **332**, 322-7.
- <sup>362</sup>Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Doležal K, Strnad M (2011) In vitro interaction of a novel neutrophil growth factor with human liver microsomal cytochromes P450 and the contribution of UDP-glucuronosyltransferases to its metabolism. *Xenobiotica* **41**, 934-44.
- <sup>363</sup>Säve S, Mohlin C, Vumma R, Persson K (2011) Activation of adenosine A2A receptors inhibits neutrophil transuroepithelial migration. *Infect Immun* **79**, 3431-7.
- <sup>364</sup>Sullivan GW, Lee DD, Ross WG, DiVietro JA, Lappas CM, Lawrence MB, Linden J (2004) Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* **75**, 127-34.
- <sup>365</sup>Sullivan GW, Linden J, Buster BL, Scheld WM (1999) Neutrophil A2A adenosine receptor inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. *J Infect Dis* **180**, 1550-60.
- <sup>366</sup>Walker BA, Rocchini C, Boone RH, Ip S, Jacobson MA (1997) Adenosine A2a receptor activation delays apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* **158**, 2926-31.

<sup>367</sup>Revan S, Montesinos MC, Naime D, Landau S, Cronstein BN (1996) Adenosine A2 receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem* **271**, 17114-8.

## 10. Seznam použitých zkratek

$\beta$ -TrCP	$\beta$ -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
Akt	proteinkinasa B
APC	adenomatous polyposis coli
APC/C	anaphase-promoting complex/cyclosome
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AURK	Aurora kinase
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl2A1	Bcl-2-related protein A1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-W	Bcl-2-like protein 2
Bcl-X <sub>L</sub>	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BLT1	LTB4 receptor
Bmf	Bcl-2 modifying factor
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BRCA	breast cancer
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
c-Abl	Abelson tyrosine kinase
c-IAP-1	cellular inhibitor of apoptosis 1
CADO	2-chloroadenosine
CAK	CDK-activating kinase
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKL	CDK-like kinase
CK1 $\delta$	casein kinase 1 $\delta$
CREB	c-AMP response element-binding protein
CTD	C-terminal domain
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole

DMARD	disease-modifying antirheumatic drugs
DMSO	dimethyl sulfoxide
DRB	5,6-dichloro-1- $\beta$ -ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB sensitivity inducing factor
DTT	dithiothreitol
Dvl2	Dishevelled 2
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EMAPII	endothelial-monocyte activating polypeptide II
EPO	erythropoietin
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESI	electrospray ionization
Ets2	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FAK	focal adhesion kinase
FANCI	Fanconi anemia complementation group 1
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein
FITC	fluorescein isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK3	glycogen synthase kinase 3
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	hypoxia-inducible factor
HPLC-DAD	high-performance liquid chromatography with photodiode array detection
Hrk	harakiri, Bcl-2-interacting protein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
CHK1	check kinase 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IL	interleukin
Jak	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase

K-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LPC	lysophosphatidylcholine
LPS	lipopolysaccharide
LRP6	low-density lipoprotein receptor-related protein 6
LTB4	leukotriene B4
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAT1	ménage à trois
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
Mdm2	mouse double minute 2
MEF	mouse embryonal fibroblast
MPO	myeloperoxidase
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Mule	Mcl-1 ubiquitin ligase
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1
NECA	5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
NELF	negative elongation factor
NET	neutrophil extracellular traps
NFκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NiNTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
Noxa	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NSCLC	non-small cell lung carcinoma
PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase-1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PDGF	platelet derived growth factor
PEG	polyethylene glycol
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

PICD	phagocytosis-induced cell death
PKC	protein kinase C
PIPES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
Pin1	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1
PMA	phorbol ester
pRb	retinoblastoma protein
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
P-TEFb	positive transcriptional elongation factor b
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RA	rheumatoid arthritis
Rho	Ras homology
RNAPII	RNA polymerase II
ROS	reactive oxygen species
Rpb	DNA-directed RNA polymerase II subunit
S1P	sphingosine-1-phosphate
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase
STAT	signal transducer and activator of transcription
Syk	spleen tyrosine kinase
TCA	trichloroacetic acid
TFIIH	transcription factor IIH
TGF	transforming growth factor
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel Lindau
Wnt	wingless/int-1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

## 11. Curriculum vitae

### Osobní údaje

Jméno a příjmení: Ladislava Vymětalová  
Narozena: 29.11.1986, Moravská Třebová  
Bydliště: Jaroměřice 377, 569 44  
E-mail: [L.Vymetalova@seznam.cz](mailto:L.Vymetalova@seznam.cz)

### Dokončené vzdělání:

2009-2011 magisterský program oboru biochemie PŘF UP v Olomouci  
2006-2009 bakalářský program oboru biochemie PŘF UP v Olomouci

### Pedagogická činnost

2011-2014 Cvičení z buněčné biologie (LRR/BUBCV)  
Vedení diplomové práce Mgr. Zuzana Skrášková (obor Molekulární a buněčná biologie, obhájeno 2015)

### Absolvované vědecké stáže

leden-červenec 2013 Institute of Inflammation and Ageing  
College of Medical and Dental Sciences  
University of Birmingham, UK  
Prof. Janet Lord

### Zapojení do grantových projektů

Aesculab – systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu OP VK 2.3 CZ.1.07/2.3.00/09.0018 (odborný pracovník)

### Seznam publikovaných prací

1. **Vymětalová L**, Kryštof V (2015) Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Med Res Rev* **35**, 1156-74. (IF 8,431)
2. **Vymětalová L**, Havlíček L, Šturc A, Skrášková Z, Jorda R, Pospíšil T, Strnad M, Kryštof V (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-



pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **110**, 291-301. (IF 3,447)

#### **Konferenční příspěvky**

1. Jorda R, Zatloukal M, Řezníčková E, **Vymětalová L**, Kryštof V, Strnad M: Novel derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Cell cycle Regulators/Inhibitors and Cancer*, Feb 5-8, 2011, Vienna, Austria.
2. **Vymětalová L**, Havlíček L, Jorda R, Kryštof V, Strnad M: Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Molecular Insights for Innovative Therapies*, Dec 1-3, 2011, Heidelberg, Germany.

## 12. Seznam příloh

1. **Vymětalová L**, Kryštof V (2015) Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Med Res Rev* **35**, 1156-74.
2. **Vymětalová L**, Havlíček L, Šturc A, Skrášková Z, Jorda R, Pospíšil T, Strnad M, Kryštof V (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2H)-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **110**, 291-301.
3. **Vymětalová L**, Kryštof V, Havlíček L, Lord J, Strnad M. Synthesis and structure relationship analysis of trisubstituted pyrazolopyrimidines with proapoptotic activity on neutrophils. *J Med Chem* (v recenzním řízení).
4. **Vymětalová L**, Havlíček L, Jorda R, Kryštof V, Strnad M: Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Molecular Insights for Innovative Therapies*, Dec 1-3, 2011, Heidelberg, Germany.

# Příloha 1

**Vymětalová L, Kryštof V (2015) Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Med Res Rev* 35, 1156-74.**

# *Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens*

*Ladislava Vymětalová and Vladimír Kryštof*

Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 11, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

Published online 25 June 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).  
DOI 10.1002/med.21354



**Abstract:** Developments in genetic and genomic technology have produced vast quantities of data that are gradually yielding new insights into fundamental cellular and molecular processes. In particular, they have revealed some differences between normal and transformed cells that could potentially be exploited to develop targeted, personalized cancer therapies with unprecedented efficiencies. This review summarizes recent findings from synthetic lethality (SL) screens against cyclin-dependent kinases (CDKs) that can be targeted with small molecule kinase inhibitors. SL screens can be used to identify cancers sensitive to CDK inhibitors. Several SL partners of specific CDKs have been identified, including MYC, K-Ras, VHL, PI3K, and PARP, all of which are discussed in the review. CDK inhibitors have been in clinical trials for nearly 20 years and it has become clear that effective therapy using these compounds will require careful selection of patients with respect to the specific molecular phenotype of their disease. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Med. Res. Rev.*, 35, No. 6, 1156–1174, 2015

**Key words:** cyclin-dependent kinase; inhibitor; cancer; drug; synthetic lethality

## **1. SYNTHETIC LETHALITY AND THE EVOLUTION OF TARGETED THERAPY**

Anticancer chemotherapeutics developed over the past century have saved many lives. However, there are still some bottlenecks that hinder their use *in vivo*. One of the main problems is their low therapeutic index, that is, the narrow concentration range within which they kill cancers without harming healthy tissues.<sup>1</sup> Most clinically used anticancer drugs kill rapidly growing cells nonspecifically, with the result that they target not only cancer cells but also certain healthy dividing cells such as hematopoietic bone marrow progenitor cells, hair follicle cells, and gastrointestinal mucosal epithelial cells.<sup>2</sup> Many normal nondividing cells are also sensitive to

---

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic; Contract grant number: LO1204. Czech Science Foundation; Contract grant number: 15-15264S.

*Correspondence to:* Vladimír Kryštof, Laboratory of Growth Regulators, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371, Olomouc, Czech Republic, E-mail: vladimir.krystof@upol.cz

*Medicinal Research Reviews*, 35, No. 6, 1156–1174, 2015  
© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

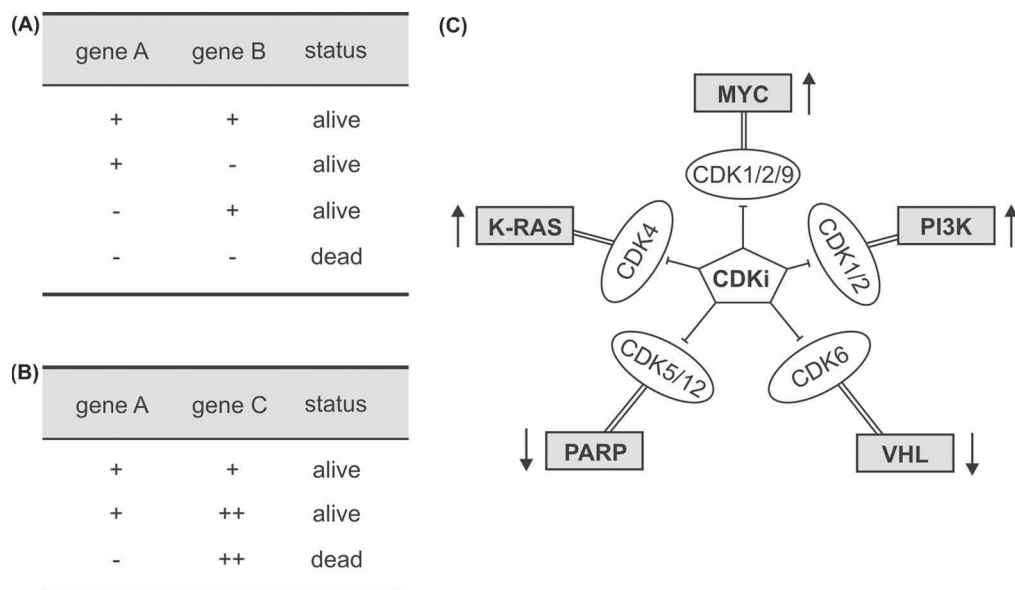
classical chemotherapeutics.<sup>3-5</sup> Consequently, there is an urgent need for a better understanding of the differences between normal and cancer cells. Such an understanding would enable the identification of targets that are only essential for the viability of tumor cells, leading to the development of new drugs targeting cancers as specifically as possible.

Tumorigenesis is a complex multistep process that often takes many years, during which cells acquire a set of genetic lesions that ultimately yield a cancerous state. It has been stated that cancers are often self-sufficient in the production of growth factors, less sensitive to growth-inhibitory signals and induction of apoptosis, unlimited in their replicative potential, and capable of inducing both angiogenesis and metastases.<sup>6</sup> These properties are typically conferred by loss of function mutations in tumor suppressor genes and gain of function mutations in oncogenes that are collectively critically important for cancer development. While they are essential for the induction of the cancerous state, these attributes can also be regarded as weaknesses that could be exploited therapeutically because they define the ways in which transformed cells differ from their normal counterparts.

A pivotal milestone in the development of molecular anticancer therapeutics was the discovery of imatinib mesylate, a potent kinase inhibitor targeting a protein encoded by a fused breakpoint cluster region (BCR)-Abelson murine leukemia viral oncogene homologue (ABL). This oncogene is activated by a translocation between chromosomes 9 and 22 in hematopoietic stem cells, and induces chronic myeloid leukemia (CML).<sup>7</sup> Imatinib proved to be strikingly effective in the treatment of CML patients and was approved for this purpose in 2001. Since then, several small molecule and monoclonal antibody inhibitors of oncogenic enzymes have been approved for therapeutic use, and many others are in various stages of clinical development.<sup>8,9</sup> While most of these agents have acceptable therapeutic indices, it is well known that they target both oncoproteins present in cancer cells and other proteins found in normal cells. Although several of the newer agents exhibit improved selectivity toward cancers, many fail in cancer treatment due to the emergence of distinct patterns of resistance based on general multidrug resistance, metabolism, compartmentalization or target-specific mutations such as point mutations, and mutations that induce oncogene overexpression. It therefore seems necessary to identify new strategies in order to overcome issues of drug resistance and find ways of targeting cells with loss of function mutations.

Over the past few years, intensive studies on cancer genetics have yielded new insights into gene-gene interactions. As a result, conventional strategies that target oncogenic pathways regardless of their impact on normal cell signaling have been outperformed by new alternatives discovered as a result of the ongoing development of genomic technologies. A very promising anticancer drug discovery method that was first described in 1922 is the so-called synthetic lethal (SL) approach.<sup>2</sup> SL is a genetic property whereby the presence of one gene allows an organism to tolerate genetic changes in a second gene that would be lethal in the absence of the first (Fig. 1A).<sup>10</sup> In some cases, simultaneous mutations in both genes may only reduce cellular fitness, resulting in a condition known as synthetic sickness. Strategies based on synthetic sickness and lethality could potentially solve a major problem of anticancer drug development by permitting the specific targeting of cancer cells with loss of function mutations in tumor suppressor genes. The products of a pair of synthetic lethal genes may be components of the same multiprotein complex, participate in parallel redundant pathways, belong to the same linear pathway, or even act in two separate pathways essential for cell viability.

Many synthetic lethal interactions have been mapped out in a range of model organisms using RNA interference. However, the field as a whole is rooted in studies on the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In 1999, a yeast knockout library was generated in which each open reading frame was replaced with a genetic marker and tagged with two specific molecular TAGs or barcodes (upstream and downstream)—20-base oligomer sequences that serve as



**Figure 1.** (A) Synthetic lethality is a genetic property whereby the presence of gene A allows a cell to tolerate mutation in gene B that would otherwise be lethal (and vice versa). (B) In an alternative version of synthetic lethality, gene A may interact with the third gene C such that increasing the expression or activity of C would be synthetically lethal when paired with the downregulation of gene A. (C) Schematic depiction of known SL interactions involving CDKs. Arrows pointing downward and upward indicate decreased and increased gene activity, respectively.

strain identifiers.<sup>11</sup> Synthetic lethal or sick interactions were then identified by crossing strains carrying mutations of interest with the array of deletion mutants after mating and sporulation. The desired interactions were readily identified because they produce haploid double mutants. However, another technique was required to quantify the double mutations effects on growth rates. To this end, the molecular barcodes in each mutant strain were flanked by universal priming sites, enabling the amplification of the tag sequences by PCR. The amplified products were hybridized to oligonucleotide arrays so that the intensity of the amplified signal could be determined.<sup>12</sup> However, many cancer-related genes do not have yeast orthologs, so it was also necessary to conduct similar studies using alternative metazoan models. The most widely used organisms for this purpose were *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, both of which enabled the use of more sophisticated RNA interference strategies than were previously possible. Unfortunately, the siRNA sequences used to induce interference in simpler model organisms elicit antiviral responses in mammalian cells, so they were replaced with shRNA encoded by plasmids or viral vectors.<sup>13,14</sup> This improved RNAi system has become a staple of novel screening strategies that enable the systematic identification of gene–gene interactions in human cells. There are two main approaches used by geneticists to map out SL relationships, referred to as the forward and reverse approaches. The forward tactic relies on the genetic variability of cancer cell lines characterized by a common mutation in a gene of interest, while the reverse strategy uses an isogenic cell line pair created by a single specific genetic change.

These approaches led to the identification of several new synthetic lethal interactions. For example, many cancers are characterized by oncogenic mutations in Ras, which is difficult to inhibit directly with small molecule inhibitors and was therefore targeted for synthetic lethal screening. It was demonstrated that cells expressing mutant K-Ras are highly dependent on the expression of TANK-binding kinase 1 (TBK1), mitotic polo-like kinase 1 (PLK1), and the

transcriptional repressor SNAIL2.<sup>15–17</sup> In a similar way it was shown that deficiencies of the tumor suppressor Rb, which are often responsible for malignant conversion, can be overcome by inactivating tuberous sclerosis complex 2 (TSC2); that overexpression of the serine/threonine-protein kinase PIM1 in prostate cancer cells can be overcome by PLK1 inhibition; and that p53 deprivation can be relieved by silencing telomerase reverse transcriptase (TERT).<sup>18–20</sup>

While novel screening strategies have revealed many new SL interactions, the limited overlap between the results obtained in different SL screening campaigns targeting the same gene indicates that there are important weaknesses in existing methodologies. The identification of three different SL partner proteins in three separate K-Ras screens is a case in point, and suggests that the genetic backgrounds of the tested cells can have significant effects on the observed lethality. The limited overlap between the results of different SL screens targeting the same protein may be due to the use of different cell lines in different studies, imperfections in RNAi-mediated gene knockdown, or off-target effects. Regardless of its causes, this variability makes it essential to thoroughly validate newly identified SL interactions using multiple independent models in order to provide a sound basis for rational patient–drug pair selection.

Except of experimental studies, many predictive approaches have been proposed, but these primarily focus on extending experimentally derived SL networks rather than de novo prediction of interactions, limiting their utility for cancer.<sup>21</sup> However, a new computational algorithm DAISY (data mining synthetic lethality identification pipeline) that aims to facilitate the large-scale identification of SLs in cancer has been described recently.<sup>22</sup> Importantly, cancer SL networks identified by DAISY included known SL partners of tumor suppressors and oncogenes. In addition, it has been shown to be useful in predicting gene essentiality, drug efficacy, and clinical prognosis.

It is not yet clear whether discovered SL interactions will ever translate into efficient therapeutics. However, the basic concept of genetic screens for SL interactions has already been applied in drug discovery screening studies. In these investigations, an inhibitor of a given protein is screened against a panel of viable cells bearing mutations in different genes to identify cases where the combination of the mutation and inhibitor results in cell death but neither is fatal by itself.<sup>23</sup> This approach has revealed SL effects of many compounds in specific cancer cell lines. At present, the most important clinical application of an SL relationship is probably the use of synthetic poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors such as olaparib or iniparib to treat breast cancers featuring deletions of BRCA-1 or BRCA-2.<sup>24</sup> BRCA-1 and 2 are necessary for the repair of DNA double-strand breaks (DSB) by homologous recombination (HR). PARP-1 is implicated in the repair of single-strand breaks (SSB) via autopoly(ADP-ribosyl)ation, in which it serves as a docking site for other proteins involved in the repair process. PARP-1 inhibition prevents the docking of these proteins, leading to the formation of multiple SSB; these SSB in turn give rise to DSB at replication forks. The DSBs would normally be repaired by HR, but this is not possible in the absence of BRCA-1 or BRCA-2 so the DNA lesions are instead repaired by nonhomologous end joining (NHEJ), leading to extensive chromosomal alterations and cell death.

The identification of cyclin-dependent kinases (CDKs) as cell cycle regulators prompted the development of several small molecule CDK inhibitors, many of which have shown promising results in the context of anticancer therapy and could be potentially exploitable in combinatorial experiments as discussed in the next section.

## **2. DEREGULATION OF CDKS IS A FREQUENT HALLMARK OF CANCER DISEASES**

The CDKs are a family of 20 serine/threonine protein kinases that are generally classified as regulators of the cell cycle (CDK1, 2, 4, 6) or transcription (CDK7, 8, 9, 11, 20). However, in the

last few years they have been shown to have diverse functions including the regulation of angiogenesis, senescence, exocytosis, spermatogenesis, and neuronal development.<sup>25</sup> CDK activity is highly dependent on the binding of regulatory subunits called cyclins, whose name derives from their oscillatory expression: they are produced and degraded during different phases of the cell cycle. To be fully activated, most CDKs must be phosphorylated by CDK7 at specific residues in their so-called T-loops.<sup>26</sup> The timing of CDK activity is also subject to negative regulation mediated by the binding of natural CDK inhibitors (INK4, Cip/Kip), and by inhibitory phosphorylation catalyzed by the Wee1 and Myt1 kinases.<sup>26,27</sup> These phosphorylations can be reversed by the cdc25 phosphatases.

The uncontrolled upregulation of CDK activity has been identified as a hallmark of cancer and several CDK hyperactivity-inducing mechanisms have been identified. Many of these mechanisms involve loss of function mutations (deletions, silencing, or point mutations) affecting genes encoding natural CDK inhibitors or the overexpression of CDK-activating cyclins. For example, excessive production of cyclin D1 has been detected in breast, bladder, esophageal, and squamous cell carcinoma.<sup>28</sup> Similarly, overproduction of cyclin E has been detected in colon, lung, and breast cancers as well as acute lymphoblastic and myeloid leukemias,<sup>29–33</sup> and cyclin A overproduction has been observed in lung carcinoma.<sup>30</sup> In addition, some breast malignancies are promoted by shortened hyperactive forms of cyclin E that are generated by proteolysis.<sup>34</sup> However, in some cases, especially those involving CDK4 and 6, hyperactivity is caused by the amplification or overexpression of the CDK gene itself.<sup>35–37</sup> Alternatively, mutations in CDK genes may affect the corresponding proteins' sensitivity to negative regulators. For example, in melanoma the R24C point mutation in CDK4 was found to cause insensitivity to inhibition by p16INK4a without affecting the variant protein's ability to bind cyclin D and form an active kinase.<sup>38</sup> Finally, CDK activation requires the removal of inhibitory phosphates by Cdc25 phosphatases, which are present at unusually high levels in certain tumors.<sup>39,40</sup> For these reasons, CDKs and their natural modulators have become important targets for anticancer drug development in recent years. Most efforts in this area have focused on small molecule inhibitors.

Over the past 20 years, many CDK inhibitors have been developed using different approaches, and around 24 have entered clinical trials (Table I, Fig. 2).<sup>41–43</sup> Most CDK inhibitors are pan-selective and block the transcriptional regulators CDK7 and CDK9 in addition to the cell cycle regulating CDKs. It was demonstrated that these compounds induce cell cycle arrest and activate apoptosis by inhibiting transcription, which is most effective in cells that are strongly dependent on the expression of antiapoptotic proteins with short half-lives such as myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1). Many groups have demonstrated that early inhibitors such as roscovitine and flavopiridol are effective against multiple myeloma and other malignancies that depend on continuous mRNA synthesis and Mcl-1 expression.<sup>44–46</sup> Inhibitors of the transcriptional CDKs also influence the stabilization of the tumor suppressor p53, probably by downregulating its target genes; these include the ubiquitin ligase Mdm2, which negatively regulates p53.<sup>47–49</sup> On the basis of various *in vitro* studies, it has been suggested that the simultaneous inhibition of multiple CDKs (i.e., CDK1, 2, and 9) could be a desirable feature of clinical drug candidates.<sup>50</sup> The justification for targeting multiple CDKs at once comes from studies on genetic models;<sup>51</sup> cells lacking one or more interphase CDKs can proliferate because most CDKs are redundant and capable of standing in for one another if one is disabled somehow. The only CDK whose functions cannot be fulfilled by some other member of the CDK family is CDK1.<sup>51,52</sup>

Although the simultaneous inhibition of several CDKs may be more efficient than selectively blocking a single CDK in many cases, there has been considerable interest in developing inhibitors specific to individual CDK isoforms over the last few years.<sup>42,53</sup> It was recently shown that many cancers are heavily dependent on the activity of a single CDK—breast cancer on



**Table I.** Some Small Molecular CDK Inhibitors in Clinical Trials

Compound (alternative name)	Target	Trial phase	Condition	References
AT7519	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK9	I/II	Lymphoma, mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma	90
BAY 1000394 (ronidociclib)	CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK7, CDK9	I/II	Neoplasms, small cell lung carcinoma	91
Flavopiridol (alvocidib, HMR 1275, L86-8275)	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDK9	I/II	Hematologic malignancies	92,93
LEE011 (ribociclib)	CDK4, CDK6	I/II	Solid tumors, lymphomas, malignant rhabdoid tumors, neuroblastoma, melanoma, breast cancer	www.cancer.gov
LY2835219 (abemaciclib)	CDK4, CDK6	I/II	Advanced cancer, mantle cell lymphoma, lymphoma, breast neoplasms, nonsmall cell lung cancer	www.cancer.gov
P1446A-05	CDK4	I	Solid tumors, hematologic malignancy	www.cancer.gov
P276-00 (rivociclib)	CDK1, CDK4, CDK9	I/II	Multiple myeloma, mantle cell lymphoma	94
PD-0332991 (palbociclib)	CDK4, CDK6	I/II/III	Solid tumors, hematologic malignancies	95
PHA-848125 (milciclib)	CDK2, CDK4, CDK7	I/II	Thymic carcinoma, solid tumors	96
Roscovitine (seliciclib, CYC202)	CDK1, CDK2, CDK5, CDK7, CDK9	I/II	Breast cancer, advanced solid tumors, nonsmall cell lung carcinoma	97,98
SCH-727965 (dinaciclib)	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	I/II/III	Hematologic malignancies, solid tumors	99
SNS-032 (BMS-387032)	CDK2, CDK7, CDK9	I	Hematologic malignancies, tumors	100
R-547	CDK1, CDK2, CDK4	I	Neoplasms	101
TG02 (SB1317)	CDK1, CDK2, CDK7, CDK9	I	Hematologic malignancies	102

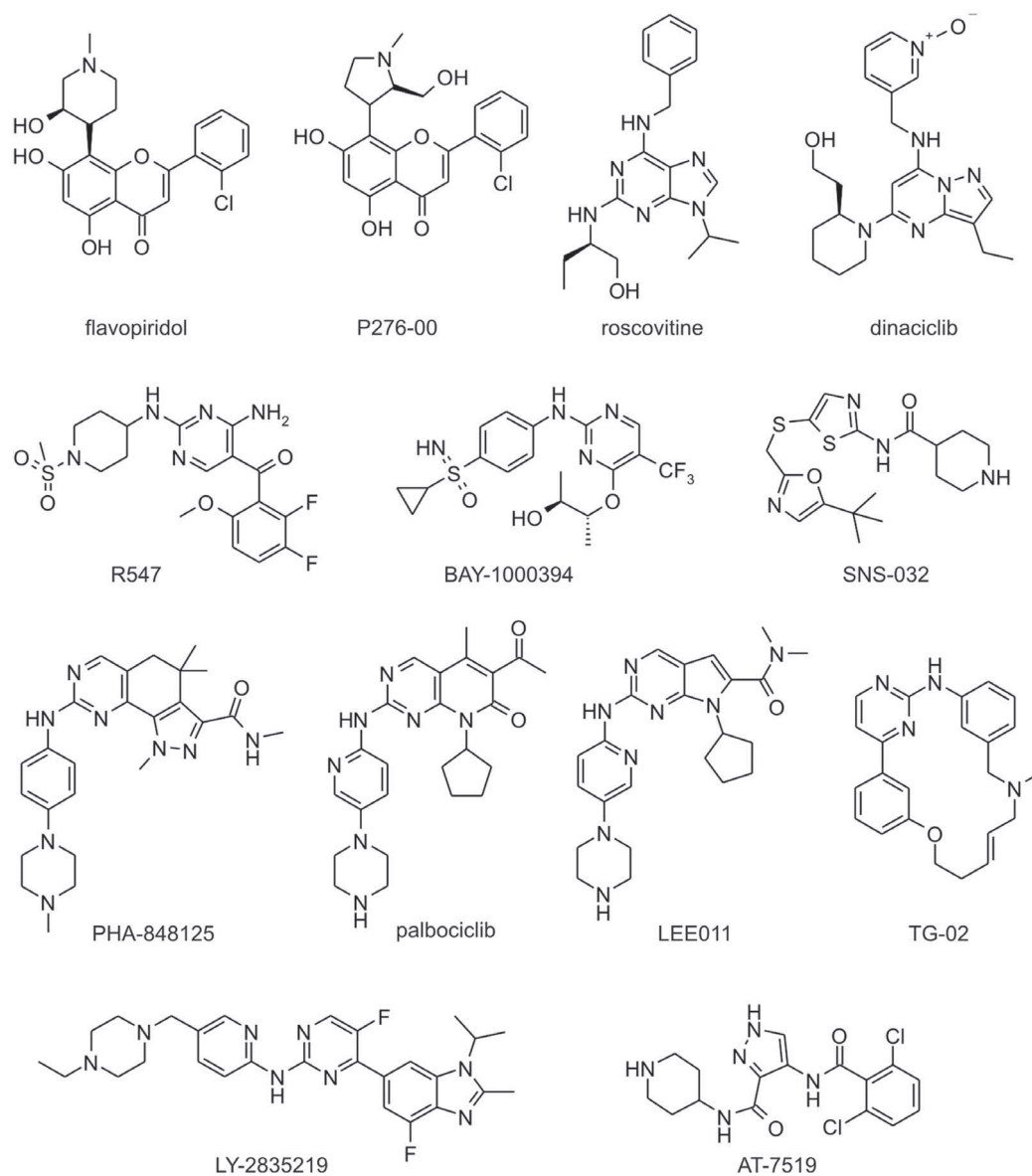


Figure 2. Chemical structures of some CDK inhibitors in clinical development.

CDK4, pancreatic cancer on CDK5, and bladder cancer on CDK6, for instance.<sup>54–56</sup> Several specific inhibitors have been designed, often with the assistance of molecular modeling. These agents include BS-181 and EXEL-8647, which target CDK7 and CDK9, respectively,<sup>57,58</sup> as well as three compounds targeting CDK4/6 that are currently undergoing clinical trials: LEE011, LY2835219, and palbociclib (granted accelerated approval by FDA in 2015).<sup>59–61</sup>

While there are currently many CDK inhibitors in clinical trials, several problems with their therapeutic use remain to be addressed. In particular, it is not straightforward to determine which patients are likely to be most sensitive to specific therapies and many current compounds have low therapeutic indices while exhibiting strong general cytotoxicity. These problems could potentially be avoided by exploiting SL.

### **3. CDK INHIBITORS CAN ENHANCE THE EFFECTIVENESS OF CURRENT CHEMOTHERAPEUTICS**

Although classical chemotherapeutics continue to dominate the clinical treatment of cancer, their limited efficacy, side effects, and susceptibility to drug resistance collectively complicate their use. Most of these compounds inhibit the functioning of the mitotic spindle, block DNA synthesis, or induce DNA damage. All of these processes lead to the activation of checkpoints followed by cell cycle arrest, during which the damage they cause may be repaired and drug resistance may be induced. Combination therapies are generally believed to avoid these problems, and in recent years a number of studies have demonstrated that combination therapies involving CDK inhibitors can have remarkable effects. Several studies examining different drug combinations have revealed synergistic effects that can be enhanced by precisely controlling the sequence and schedule on which the various agents are administered.

Flavopiridol was the first pan-selective CDK inhibitor and the most extensively studied. It has been tested in combination with diverse classical chemotherapeutic agents, resulting in the identification of some combination therapies that are currently undergoing clinical trials. For instance, it was shown to enhance the anticancer effect of paclitaxel, a microtubule-interfering agent that inhibits mitosis.<sup>62</sup> Paclitaxel monotherapy induced a transient increase in cyclin B1 expression and CDK1 activation followed by mitotic exit without cytokinesis. Subsequent inhibition of CDK1 using flavopiridol accelerated mitotic exit, activated caspase-3, and induced PARP cleavage. Interestingly, the two drugs had antagonistic effects if the order of treatment was reversed by applying flavopiridol before paclitaxel because flavopiridol pretreatment prevented mitotic entry. This finding demonstrates the importance of applying combination therapies in the correct sequence.<sup>62</sup> Similar results were obtained when using flavopiridol in combination with docetaxel, a semisynthetic paclitaxel analogue.<sup>63</sup> In another example, SN-38, an active metabolite of the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11, induced p21 expression and G2 arrest in the HCT-116 gastric cancer cell line without activating apoptosis; this failure of apoptotic induction could be overcome by subsequent treatment with flavopiridol,<sup>64</sup> which caused the activation of caspase-3 and the cleavage of p21 and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). A third example is the combination of flavopiridol with gemcitabine, a ribonucleotide reductase inhibitor. In several cases, gemcitabine monotherapy has led to resistance due to up-regulation of the mRNA and protein expression of the ribonucleotide reductase M2 subunit.<sup>65</sup> Flavopiridol treatment suppressed this resistance by downregulating the expression of the transcription factor E2F-1 in gemcitabine-treated cells, causing a reduction in the expression of the ribonucleotide reductase M2 subunit.<sup>65</sup>

Based on this body of evidence, clinical trials on a range of combination therapies involving various CDK inhibitors have been initiated (see Supporting Information Table I). The extensively investigated CDK inhibitor flavopiridol has been the subject of several such studies, usually in combination with DNA targeting agents with which it exhibited strong synergistic effects in preclinical settings. Given the known involvement of certain CDKs in DNA damage repair processes,<sup>66</sup> it is tempting to speculate that these synergies could be due to cell death arising from the blockage of DNA repair. There have also been several clinical trials involving the use of microtubule-interfering agents in conjunction with CDK inhibitors because such combinations have yielded promising results in animal models.<sup>62,67</sup>

In addition to classical chemotherapeutics, CDK inhibitors are being tested as components of therapeutic cocktails featuring more recently developed molecularly targeted drugs (including biologics) for which clear mutual potentiation has been observed *in vitro* or *in vivo*. The striking results obtained in these models support the hypothesis that simultaneously blocking multiple signaling pathways may confer superior clinical efficacy. Therefore, various combinations of CDK inhibitors with inhibitors of mitogen transducing kinases (both receptor and cytoplasmic

kinases), proteasome inhibitors, or antiestrogens have been designed for clinical evaluation (see Supporting Information Table I).

The examples mentioned above clearly show that CDK inhibitors can potentiate the activity of current chemotherapeutic agents. However, more effective anticancer strategies could potentially be developed by specifically targeting individual cancer-related genes in order to exploit SL interactions in patients whose genetic background is known.

#### **4. SYNTHETIC LETHALITY OF CDK INHIBITORS IN THE TREATMENT OF SPECIFIC TUMOR DISEASES**

##### **A. CDK1/2 and Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)**

Glioblastoma multiforme is the most common and aggressive astrocytoma, and has poor prognostic outcomes despite the availability of several multimodal therapies. Almost half of all astrocytomas are characterized by an amplification of the epidermal growth factor receptor (EGFR), which subsequently overactivates PI3K leading to a deregulation of the protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway.<sup>68</sup> The malignant conversion is also influenced by gain of function mutations in PI3K $\alpha$  and loss of function mutations in tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN), which negatively regulates PI3K activity.<sup>69</sup> Early efforts to develop targeted glioblastoma treatments largely focused on small molecule inhibitors of EGFR, PI3K, or mTOR. This approach yielded disappointing results, inducing cytostatic effects rather than cell death. However, the screening of inhibitors of PI3K isoforms led to the identification of the imidazopyridine PI-75, which effectively induced apoptosis in glioma cell lines expressing wild-type PTEN without affecting PTEN mutant cell lines.<sup>70</sup> Treatment of a wild-type PTEN cell line with the PTEN inhibitor bisperoxovanadium in combination with PI-75 caused increased phosphorylation of Akt and attenuated cell death without affecting G2/M arrest. Surprisingly, computational studies indicated that PI-75 is also a strong inhibitor of CDK1 and 2.<sup>70</sup> While the inhibition of single CDKs (CDK1 or CDK2) or CDK1 and PI3K $\alpha$  had no impact on apoptosis in glioma cells expressing wild-type PTEN, combined CDK2 and PI3K $\alpha$  inhibition increased cell death, albeit to a lesser extent than was observed following PI-75 treatment. This finding was confirmed by siRNA experiments, in which the silencing of CDK1 or 2 alone after treatment with a PI3K $\alpha$  inhibitor did not influence apoptosis in glioma cells expressing wild-type PTEN. This may indicate that CDK1 can compensate for the absence of CDK2 and vice versa.<sup>71</sup> However, the simultaneous silencing of both CDKs significantly reduced the viability of cells treated with the PI3K $\alpha$  inhibitor. In keeping with this finding, overexpression of CDK1 and 2 attenuated apoptosis in glioma cells expressing wild-type PTEN. Similarly, a combination of the CDK1/2 inhibitor roscovitine with a PI3K $\alpha$  inhibitor reduced tumor size in mice xenografts more effectively than monotherapy with either agent alone. All of these results suggest that it should be possible to use combination therapies based on CDK1/2 and PI3K inhibitors to treat patients with gliomas expressing wild-type PTEN.

##### **B. CDK1/2/9 and MYC**

Neuroblastomas are embryonal tumors that arise from the sympathetic nervous system and are the second most common cause of cancer-related deaths in children.<sup>72</sup> They are associated with a range of molecular changes including MYCN amplification, which is found in 20–30% of all neuroblastomas and is linked to advanced disease with bad prognosis.<sup>73</sup> As a ligand-independent transcription factor, MYCN is very challenging to drug. Interestingly, CDK2 was shown to have a strong effect on the viability of MYCN-amplified neuroblastomas: its silencing

using siRNA or shRNA induced apoptosis in MYCN-amplified neuroblastoma cell lines.<sup>74</sup> However, the simultaneous silencing of MYCN and CDK2 had no impact on cell viability, suggesting that these two proteins have an SL relationship. Subsequent experiments demonstrated that both roscovitine and the related compound CR8 are potent inducers of apoptosis in MYCN-positive cells but have no effects in MYCN-negative neuroblastoma lines.<sup>74,75</sup>

Various other cancers overexpress the closely related *MYC* oncogene, which encodes a transcription factor that regulates the expression of genes controlling cell growth, division, and apoptosis.<sup>76</sup> Using a panel of fibroblast human cell lines expressing nine common oncogenes, it was shown that *MYC*-overexpressing cells were highly sensitive to the induction of apoptosis by purvalanol A (a CDK inhibitor related to roscovitine).<sup>77</sup> Importantly, this sensitivity correlated well with the strength of the cells' expression of *MYC*. Artificially induced Bcl-2 overexpression prevented cell death in both normal and *MYC*-overexpressing cells treated with purvalanol A, demonstrating that the apoptosis observed in drug-treated cells was due to mitochondrial depolarization. This effect was attributed to a drug-induced destabilization of survivin, an inhibitor of apoptosis whose activity depends on phosphorylation by CDK1.<sup>78</sup> The anticancer efficacy of purvalanol A was also confirmed in mouse models of lymphoma and hepatoblastoma, further supporting the proposed interaction between CDK1 and *MYC*.<sup>77</sup>

The SL interaction between *MYC* and CDK1 could potentially be exploited in the treatment of triple-negative breast cancer, which is resistant to drugs targeting the HER2, estrogen, and progesterone receptors.<sup>79,80</sup> CDK1 silencing using siRNA decreased the viability of triple-negative breast cancer cell lines and suppressed tumor growth in mice xenografts.<sup>79</sup> Two small molecule CDK inhibitors, purvalanol A and dinaciclib, induced significant apoptosis in several triple-negative cell lines with elevated *MYC* expression as well as in related mouse xenograft models.<sup>80</sup> CDK1 is not the only CDK that has a synthetic lethal relationship with *MYC*: studies on hepatocellular carcinomas revealed that CDK9 was required for their survival and its pharmacological or shRNA-mediated inhibition caused robust antitumor effects whose magnitude correlated with *MYC* expression levels.<sup>81</sup>

It can be difficult to unravel synthetic lethal relationships involving CDKs because of the broad specificity patterns of established CDK inhibitors and because these proteins exhibit pronounced functional redundancy such that one CDK can often compensate for deficiencies in the activity of another. However, a remarkable study in which CDK4, CDK2, and CDK1 were inhibited specifically and separately using either RNAi or small molecule inhibitors showed that only CDK1 inhibition rapidly decreased the viability of *MYC*-dependent cells.<sup>82</sup> The suggested mechanism of SL between CDK1 and *MYC* is based on the induction of mitotic catastrophe by CDK1 depletion, which may promote *MYC*-induced replication stress and subsequently activate checkpoint signaling, resulting in cell death.

### C. *CDK6* and *VHL*

The inactivation of the Von Hippel Lindau (*VHL*) tumor suppressor gene, which serves as a regulator of hypoxia-inducible factor  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ), is a frequent hallmark of clear cell renal carcinomas (RCC).<sup>83</sup> In the presence of oxygen (normoxia), HIF- $\alpha$  becomes hydroxylated at one or two prolyl residues to form a binding site for VHL, a component of the ubiquitin ligase complex that directs the polyubiquitinylation of HIF- $\alpha$ . On the other hand, a lack of oxygen leads to an accumulation of HIF- $\alpha$ , which then binds HIF- $\beta$ . The HIF- $\alpha/\beta$  heterodimer acts as a transcriptional factor of genes involved in acute or chronic adaptation to hypoxia such as vascular endothelial growth factor (*VEGF*), platelet-derived growth factor B (*PDGF-B*), tumor growth factor  $\alpha$  (*TGF $\alpha$* ), and erythropoietin.<sup>83</sup> Loss of VHL leads to an activation of kinases such as EGFR, c-Met, VEGFR, or PDGFR, which can support invasiveness, angiogenesis, and

metastasis.<sup>84</sup> Renal tumors generally do not respond to conventional treatment and therefore require novel therapies. The scope for specifically targeting VHL-negative cells was investigated using isogenic cell lines derived from RCC patients of different VHL status.<sup>84</sup> Focused silencing of individual kinases resulted in the identification of three genes that reduced the viability of VHL<sup>-/-</sup> RCC cell lines: *c-Met*, *CDK6*, and *MAP2K1*. A synthetic lethal interaction between VHL and CDK6 was then confirmed by experiments using a small molecule CDK4/6 inhibitor (CAS 546102-60-7), which only blocked the growth of VHL<sup>-/-</sup> cells. This finding suggests that CDK6 inhibitors could potentially be useful in the treatment of VHL<sup>-/-</sup> RCC.

#### **D. CDK4 and K-Ras**

Given the role of CDK4/6 in the conjunction of mitogenic signaling and cell cycle regulation, it was not a surprise when CDK4 was revealed as a promising target in cancers overexpressing K-Ras.<sup>85</sup> Inducible overexpression of K-Ras in mouse embryonic fibroblasts was found to overcome the typical replicative senescence response of cells exposed to culture shock, while CDK4 ablation restored this senescence. K-Ras-positive tumor cell lines were sensitive to CDK4 silencing while cell lines lacking K-Ras were unaffected. Moreover, the induction of K-Ras expression in murine xenograft models with a loss of CDK4 significantly reduced their tumor burden, and all of the tumors that did arise were benign. It was also demonstrated that K-Ras-positive cells with a loss of CDK4 undergo senescence in a way that is normally observed only in lung cells. Mice with induced K-Ras overexpression were treated with the CDK4-specific inhibitor PD0332991. After 30 days, less than 20% of all animals developed lesions compared to 75% for control mice. Biochemical analysis revealed a decrease in Rb phosphorylation at serines 807 and 811 in the treated mice; both of these residues are targets of CDK4. However, no senescence response was detected in cells treated with a CDK4 inhibitor, suggesting that CDK4 activity was not adequately suppressed. It would therefore be desirable to develop more potent CDK4 inhibitors and test their usefulness in the treatment of K-Ras-positive NSCLC. The synthetic lethal relationship between K-Ras and CDK4 was subsequently observed in a K-Ras overexpressing NSCLC cell line, in which CDK4 silencing reduced cell proliferation, as well as in a murine xenograft model, in which it inhibited tumor growth.<sup>86</sup>

#### **E. CDK5/12 and PARP**

As noted in the introduction the SL relationships that have been most widely exploited in the clinic are those associated with PARP inhibition. Turner et al. searched for additional SL interactions between PARP and DNA damage response proteins by performing a screen using an siRNA library targeting 779 human kinases and kinase-associated genes in a breast cancer cell line.<sup>87</sup> This approach yielded six on-target hits, the most notable of which was CDK5. The SL relationship between PARP and CDK5 was subsequently confirmed by experiments using HeLa cells treated with a PARP inhibitor: CDK5-silenced cells were more sensitive than controls to DNA-damaging agents such as camptothecin and cisplatin. CDK5 silencing in cells treated with the PARP inhibitor caused a striking increase in  $\gamma$ H2AX phosphorylation and an increase in the abundance of RAD51 foci even in the absence of exogenous DNA damage. Thus, CDK5 silencing in PARP-inhibited HeLa cells causes failures of SSB repair that lead to DSB formation but has no effect on HR or NHEJ. Interestingly, when CDK5-silenced cells were irradiated, they exhibited radiation-resistant DNA synthesis and an unusually high proportion of cells were found to be in mitosis after irradiation, suggesting that CDK5 controls an intra S-phase checkpoint that normally prevents mitotic progression in cells with DNA damage. While its precise function in the various cell cycle checkpoints remains unclear, it may act via SCF ubiquitin ligase or some noncatalytic interaction with DNA-damage kinases. In

conclusion, PARP inhibition causes the accumulation of SSBs; when this is paired with a failure of an intra-S-phase checkpoint due to the absence of CDK5, the result is an increased rate of replication fork collapse that leads to cell death. These results suggest that PARP inhibitors may be particularly effective in the treatment of patients with CDK5 loss of function mutations. They also suggest that in addition to their uses in treating patients with BRCA1 or BRCA2 deficiencies, PARP inhibitors may be useful for other malignancies when applied in combination with CDK5 inhibitors.

In an effort to identify even more genes for which loss of function might predict sensitivity to PARP inhibitors, Bajrami et al. performed a genome-wide synthetic lethal screen using the PARP inhibitor olaparib.<sup>88</sup> Their analysis showed that the cytotoxicity of olaparib is governed by the status of the DNA damage response apparatus as well as genes that proofread chromatin remodeling and regulate sister chromatid cohesion. Of the genes identified in this work, *CDK12* stands out as a potential predictive biomarker for responsiveness to PARP1/2 inhibitors. CDK12 is a regulator of RNA polymerase II and is also important in HR. High-grade serous ovarian cancer (HGS-OVCa), a disease characterized by a high frequency of familial and somatic BRCA mutations, was selected as a model in which to evaluate the synthetic lethal relationship between PARP1/2 and CDK12 based on its susceptibility to olaparib after carboplatin treatment. The loss of CDK12 function may sensitize HGS-OV cells to PARP1/2 inhibitors because it reduces the expression of key DNA repair genes such as *BRCA1*, *FANCI*, *FANCD2*, and *ATR*, rendering the cell deficient in HR.<sup>88,89</sup> Consequently, the SSBs induced by PARP1/2 inhibition are not effectively repaired, leading to cell death.

## 5. CONCLUSION

For a long time, attempts to treat patients with tumors could be likened to “tilting at windmills” due to the heterogeneity of cancer and related diseases. While treatments with classical chemotherapeutics often initially provide good outcomes, different patterns of resistance appear in many patients. In addition, these drugs are characterized by high levels of general toxicity and severe side effects. However, developments in genetics and genomic technologies have made it possible to explore the genetic basis of diverse tumors, leading to the identification of novel molecular targets whose specific inhibition offers the potential for more effective treatment that can overcome resistance. In recent years, many drugs targeting specific cancer-related proteins have been developed, several of which have been approved for clinical use. Although no CDK inhibitor has yet been approved for cancer therapy several phase III clinical trials involving such agents are underway. There has been quite a large gap between the development of the first CDK inhibitors and their use in phase II/III trials for several reasons including their low therapeutic indices (especially in monotherapy) and a lack of robust criteria for selecting patients who are likely to respond well to such therapies. Hopefully, these problems could potentially be avoided by exploiting SL. Studies on this phenomenon, which was first demonstrated in yeasts before being explored further in cell lines and model organisms, have revealed a range of gene–gene interactions that could potentially be exploited to develop novel targeted therapies that will make it possible to effectively treat previously incurable tumors and provide more effective therapies, perhaps based on CDK inhibition, with fewer side effects for other cancers.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic via the National Program of Sustainability I (grant LO1204) and from the Czech Science Foundation (grant 15-15264S).

## REFERENCES

1. Muller PY, Milton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:751–761.
2. Kaelin WG. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2005;5:689–698.
3. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 2012;18:1639–1642.
4. Lazarus HM, Herzig RH, Herzig GP, Phillips GL, Roessmann U, Fishman DJ. Central nervous system toxicity of high-dose systemic cytosine arabinoside. *Cancer* 1981;48:2577–2582.
5. DeLena M, Guzzon A, Monfardini S, Bonadonna G. Clinical, radiologic, and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC-125066). *Cancer Chemother Rep* 1972;56:343–356.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
7. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497–1501.
8. Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Möbitz H, Martiny-Baron G. Targeting cancer with small-molecular-weight kinase inhibitors. *Methods Mol Biol* 2012;795:1–34.
9. Johnson LN. Protein kinase inhibitors: Contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys* 2009;42:1–40.
10. Hartman JL, 4th, Garvik B, Hartwell L. Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 2001;291:1001–1004.
11. Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 1999;285:901–906.
12. Ooi SL, Shoemaker DD, Boeke JD. DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* 2003;35:277–286.
13. Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 2002;418:430–434.
14. Paddison PJ, Hannon GJ. RNA interference: The new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2002;2:17–23.
15. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, Fröhling S, Chan EM, Sos ML, Michel K, Mermel C, Silver SJ, Weir BA, Reiling JH, Sheng Q, Gupta PB, Wadlow RC, Le H, Hoersch S, Wittner BS, Ramaswamy S, Livingston DM, Sabatini DM, Meyerson M, Thomas RK, Lander ES, Mesirov JP, Root DE, Gilliland DG, Jacks T, Hahn WC. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009;462:108–112.
16. Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK, Elledge SJ. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* 2009;137:835–848.
17. Wang Y, Ngo VN, Marani M, Yang Y, Wright G, Staudt LM, Downward J. Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 2010;29:4658–4670.
18. Gordon GM, Du W. Targeting Rb inactivation in cancers by synthetic lethality. *Am J Cancer Res* 2011;1:773–786.



19. vander Meer R, Yong Song H, Park SH, Abdulkadir SA, Roh M. RNAi screen identifies a synthetic lethal interaction between PIM1 overexpression and PLK1 inhibition. *Clin Cancer Res* 2014;20:3211–3221.
20. Xie L, Gazin C, Park SM, Zhu LJ, Debily MA, Kittler EL, Zapp ML, Lapointe D, Gobeil S, Virbasius CM, Green MR. A synthetic interaction screen identifies factors selectively required for proliferation and TERT transcription in p53-deficient human cancer cells. *PLoS Genet* 2012;8:e1003151.
21. Ryan CJ, Lord CJ, Ashworth A. DAISY: Picking synthetic lethals from cancer genomes. *Cancer Cell* 2014;26:306–308.
22. Jerby-Arnon L, Pfetzer N, Waldman YY, McGarry L, James D, Shanks E, Seashore-Ludlow B, Weinstock A, Geiger T, Clemons PA, Gottlieb E, Ruppin E. Predicting cancer-specific vulnerability via data-driven detection of synthetic lethality. *Cell* 2014;158:1199–1209.
23. Hartwell LH, Szankasi P, Roberts CJ, Murray AW, Friend SH. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* 1997;278:1064–1068.
24. Underhill C, Toulmonde M, Bonnefoi H. A review of PARP inhibitors: From bench to bedside. *Ann Oncol* 2011;22:268–279.
25. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 2014;15:122.
26. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999;287:821–828.
27. Boutros R, Ducommun B. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle* 2008;7:401–406.
28. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:67–108.
29. Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1986–1989.
30. Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T. Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 1998;153:963–972.
31. Keyomarsi K, Conte D, Jr, Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 1995;11:941–950.
32. Scuderi R, Palucka KA, Pokrovskaja K, Björkholm M, Wiman KG, Pisa P. Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood* 1996;87:3360–3367.
33. Iida H, Towatari M, Tanimoto M, Morishita Y, Kodera Y, Saito H. Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1997;90:3707–3713.
34. Porter DC, Zhang N, Danes C, McGahren MJ, Harwell RM, Faruki S, Keyomarsi K. Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* 2001;21:6254–6269.
35. Nagel S, Leich E, Quentmeier H, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, Zettl A, Rosenwald A, MacLeod RA. Amplification at 7q22 targets cyclin-dependent kinase 6 in T-cell lymphoma. *Leukemia* 2008;22:387–392.
36. Faussillon M, Monnier L, Junien C, Jeanpierre C. Frequent overexpression of cyclin D2/cyclin-dependent kinase 4 in Wilms' tumor. *Cancer Lett* 2005;221:67–75.
37. Tang LH, Contractor T, Clausen R, Klimstra DS, Du YC, Allen PJ, Brennan MF, Levine AJ, Harris CR. Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased cdk4/cdk6. *Clin Cancer Res* 2012;18:4612–4620.
38. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 1996;12:97–99.
39. Wang Z, Trope CG, Flørenes VA, Suo Z, Nesland JM, Holm R. Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. *BMC Cancer* 2010;10:233.

40. Xing X, Chen J, Chen M. Expression of CDC25 phosphatases in human gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2008;53:949–953.
41. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:547–566.
42. Kryštof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 2010;11:291–302.
43. Bruyère C, Meijer L. Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:772–779.
44. Raje N, Kumar S, Hideshima T, Roccaro A, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Chauhan D, Munshi NC, Green SR, Anderson KC. Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* 2005;106:1042–1047.
45. Gojo I, Zhang B, Fenton RG. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* 2002;8:3527–3538.
46. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxystaurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:393–397.
47. Lohrum MA, Ludwig RL, Kubbutat MH, Hanlon M, Vousden KH. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 2003;3:577–587.
48. Dai MS, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 2004;279:44475–44482.
49. Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L, Lu H. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 2004;24:7654–7668.
50. Cai D, Latham VM, Jr, Zhang X, Shapiro GI. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:9270–9280.
51. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007;448:811–815.
52. Echalié A, Cot E, Camasses A, Hodimont E, Hoh F, Jay P, Sheinerman F, Krasinska L, Fisher D. An integrated chemical biology approach provides insight into Cdk2 functional redundancy and inhibitor sensitivity. *Chem Biol* 2012;19:1028–1040.
53. Cicens J, Valius M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1409–1418.
54. Reddy HK, Mettus RV, Rane SG, Graña X, Litvin J, Reddy EP. Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neu-induced breast tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65:10174–10178.
55. Eggers JP, Grandgenett PM, Collisson EC, Lewallen ME, Tremayne J, Singh PK, Swanson BJ, Andersen JM, Caffrey TC, High RR, Ouellette M, Hollingsworth MA. Cyclin-dependent kinase 5 is amplified and overexpressed in pancreatic cancer and activated by mutant K-Ras. *Clin Cancer Res* 2011;17:6140–6150.
56. Wang G, Zheng L, Yu Z, Liao G, Lu L, Xu R, Zhao Z, Chen G. Increased cyclin-dependent kinase 6 expression in bladder cancer. *Oncol Lett* 2012;4:43–46.
57. Ali S, Heathcote DA, Kroll SH, Jogalekar AS, Scheiper B, Patel H, Brackow J, Siwicka A, Fuchter MJ, Periyasamy M, Tolhurst RS, Kanneganti SK, Snyder JP, Liotta DC, Aboagye EO, Barrett AG, Coombes RC. The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Res* 2009;69:6208–6215.
58. Heuer TS. Discovery of selective CDK9 small molecule inhibitors: CDK9 inhibition in tumor cells is associated with inhibition of proliferation and induction of apoptosis. AACR-NCIEORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Geneva, Switzerland; October 21–24, 2008.

59. Rader J, Russell MR, Hart LS, Nakazawa MS, Belcastro LT, Martinez D, Li Y, Carpenter EL, Attiyeh EF, Diskin SJ, Kim S, Parasuraman S, Caponigro G, Schnepf RW, Wood AC, Pawel B, Cole KA, Maris JM. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:6173–6182.
60. Tate SC, Cai S, Ajamie RT, Burke T, Beckmann RP, Chan EM, DeDios A, Wishart GN, Gelbert LM, Cronier DM. Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the antitumor activity of LY2835219, a new cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in mice bearing human tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2014;20:3763–3774.
61. Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, Ginther C, Atefi M, Chen I, Fowst C, Los G, Slamon DJ. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* 2009;11:R77.
62. Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:1876–1883.
63. Motwani M, Rizzo C, Sirotnak F, She Y, Schwartz GK. Flavopiridol enhances the effect of docetaxel in vitro and in vivo in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003;2:549–555.
64. Motwani M, Jung C, Sirotnak FM, She Y, Shah MA, Gonen M, Schwartz GK. Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts. *Clin Cancer Res* 2001;7:4209–4219.
65. Jung CP, Motwani MV, Schwartz GK. Flavopiridol increases sensitization to gemcitabine in human gastrointestinal cancer cell lines and correlates with down-regulation of ribonucleotide reductase M2 subunit. *Clin Cancer Res* 2001;7:2527–2536.
66. Johnson N, Shapiro GI. Cyclin-dependent kinases (cdks) and the DNA damage response: Rationale for cdk inhibitor-chemotherapy combinations as an anticancer strategy for solid tumors. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:1199–1212.
67. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2002;2:43–54.
68. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6899–6903.
69. Sami A, Karsy M. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma: Novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumor Biol* 2013;34:1991–2002.
70. Cheng CK, Gustafson WC, Charron E, Houseman BT, Zunder E, Goga A, Gray NS, Pollok B, Oakes SA, James CD, Shokat KM, Weiss WA, Fan QW. Dual blockade of lipid and cyclin-dependent kinases induces synthetic lethality in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:12722–12727.
71. Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 2003;35:25–31.
72. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106–2120.
73. Lodrini M, Oehme I, Schroeder C, Milde T, Schier MC, Kopp-Schneider A, Schulte JH, Fischer M, DePreter K, Pattyn F, Castoldi M, Muckenthaler MU, Kulozik AE, Westermann F, Witt O, Deubzer HE. MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2013;41:6018–6033.
74. Molenaar JJ, Ebus ME, Geerts D, Koster J, Lamers F, Valentijn LJ, Westerhout EM, Versteeg R, Caron HN. Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:12968–12973.
75. Delehouzé C, Godl K, Loaëc N, Bruyère C, Desban N, Oumata N, Galons H, Roumeliotis TI, Giannopoulou EG, Grenet J, Twitchell D, Lahti J, Mouchet N, Galibert MD, Garbis SD, Meijer L. CDK/CK1 inhibitors roscovitine and CR8 downregulate amplified MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2013;33:5675–5687.

76. Li Y, Casey SC, Felsher DW. Inactivation of MYC reverses tumorigenesis. *J Intern Med* 2014;276:52–60.
77. Goga A, Yang D, Tward AD, Morgan DO, Bishop JM. Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat Med* 2007;13:820–827.
78. Barrett RM, Osborne TP, Wheatley SP. Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle* 2009;8:278–283.
79. Liu Y, Zhu YH, Mao CQ, Dou S, Shen S, Tan ZB, Wang J. Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. *J Control Release* 2014;192:114–121.
80. Horiuchi D MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med* 2012;209:679–696.
81. Huang CH, Lujambio A, Zuber J, Tschaharganeh DF, Doran MG, Evans MJ, Kitzing T, Zhu N, deStanchina E, Sawyers CL, Armstrong SA, Lewis JS, Sherr CJ, Lowe SW. CDK9-mediated transcription elongation is required for MYC addiction in hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 2014;28:1800–1814.
82. Kang J, Sergio CM, Sutherland RL, Musgrove EA. Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2014;14:32.
83. Shen C, Kaelin WG, Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2013;23:18–25.
84. Bommi-Reddy A, Almeciga I, Sawyer J, Geisen C, Li W, Harlow E, Kaelin WG, Jr, Grueneberg DA. 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;105:16484–16489.
85. Puyol M, Martín A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaría D, Barbacid M. 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.
86. Mao CQ, Xiong MH, Liu Y, Shen S, Du XJ, Yang XZ, Dou S, Zhang PZ, Wang J. Synthetic lethal therapy for KRAS mutant non-small-cell lung carcinoma with nanoparticle-mediated CDK4 siRNA delivery. *Mol Ther* 2014;22:964–973.
87. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, Rayter S, Tutt AN, Ashworth A. A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor. *EMBO J* 2008;27:1368–1377.
88. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R, Campbell J, Sims D, Rafiq R, Hooper S, Chen L, Kozarewa I, Assiotis I, Fenwick K, Natrajan R, Lord CJ, Ashworth A. Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer Res* 2014;74:287–297.
89. Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM. Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Biol Chem* 2014;289:9247–9253.
90. Squires MS, Feltell RE, Wallis NG, Lewis EJ, Smith DM, Cross DM, Lyons JF, Thompson NT. Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* 2009;8:324–332.
91. Siemeister G, Lücking U, Wengner AM, Lienau P, Steinke W, Schatz C, Mumberg D, Ziegelbauer K. BAY 1000394, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, with potent antitumor activity in mono- and in combination treatment upon oral application. *Mol Cancer Ther* 2012;11:2265–2273.
92. Sedlacek H, Czech J, Naik R, Kaur G, Worland P, Losiewicz M, Parker B, Carlson B, Smith A, Senderowicz A, Sausville E. Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol* 1996;9:1143–1168.
93. Chao SH, Fujinaga K, Marion JE, Taube R, Sausville EA, Senderowicz AM, Peterlin BM, Price DH. Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J Biol Chem* 2000;275:28345–28348.

94. Joshi KS, Rathos MJ, Joshi RD, Sivakumar M, Mascarenhas M, Kamble S, Lal B, Sharma S. In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Mol Cancer Ther* 2007;6:918–925.
95. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK, Toogood PL. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1427–1438.
96. Brasca MG, Amboldi N, Ballinari D, Cameron A, Casale E, Cervi G, Colombo M, Colotta F, Croci V, D'Alessio R, Fiorentini F, Isacchi A, Mercurio C, Moretti W, Panzeri A, Pastori W, Pevarello P, Quartieri F, Roletto F, Traquandi G, Vianello P, Vulpetti A, Ciomei M. Identification of N,1,4,4-tetramethyl-8-{{[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]amino}-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide (PHA-848125), a potent, orally available cyclin dependent kinase inhibitor. *J Med Chem* 2009;52:5152–5163.
97. Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997;243:527–536.
98. Kapasi AJ, Spector DH. Inhibition of the cyclin-dependent kinases at the beginning of human cytomegalovirus infection specifically alters the levels and localization of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases cdk9 and cdk7 at the viral transcriptosome. *J Virol* 2008;82:394–407.
99. Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2344–2353.
100. Chen R, Wierda WG, Chubb S, Hawtin RE, Fox JA, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:4637–4645.
101. DePinto W, Chu XJ, Yin X, Smith M, Packman K, Goelzer P, Lovey A, Chen Y, Qian H, Hamid R, Xiang Q, Tovar C, Blain R, Nevins T, Higgins B, Luistro L, Kolinsky K, Felix B, Hussain S, Heimbrook D. In vitro and in vivo activity of R547: A potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2644–2658.
102. Goh KC, Novotny-Diermayr V, Hart S, Ong LC, Loh YK, Cheong A, Tan YC, Hu C, Jayaraman R, William AD, Sun ET, Dymock BW, Ong KH, Ethirajulu K, Burrows F, Wood JM. TG02, a novel oral multi-kinase inhibitor of CDKs, JAK2 and FLT3 with potent anti-leukemic properties. *Leukemia* 2012;26:236–243.

---

**Ladislava Vymětalová** obtained her master's degree in *Biochemistry* from *Palacký University in Olomouc, the Czech Republic*, in 2011. Since then she has been a postgraduate student of *Biochemistry* at the *Department of Biochemistry* in the same university. Her research focuses on the biochemical characterization of novel small molecules with anticancer and anti-inflammatory activities.

**Vladimír Kryštof** graduated in 1996 from the *Faculty of Science, Palacký University in Olomouc*, with an *M.Sc. in analytical chemistry*. In the same year, he started his postgraduate studies in *medical biology* at the university's *Department of Biology* within the *Faculty of Medicine*. In 2002, he defended his *Ph.D. thesis* on the screening and characterization of cytokinin-derived inhibitors of cyclin-dependent kinases and continued to pursue work in the same field at his alma mater's *Laboratory of Growth Regulators*. His research expertise includes the design, development, and characterization of novel small-molecule inhibitors of protein kinases.

***SUPPORTING INFORMATION***

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

**Table S1.** Clinical combination of CDK inhibitors with current chemotherapeutics (source: clinicaltrials.gov)

# Příloha 2

**Vymětalová L**, Havlíček L, Štunc A, Skrášková Z, Jorda R, Pospíšil T, Strnad M, Kryštof V (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **110**, 291-301.



Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

## Research paper

5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinasesLadislava Vymětalová <sup>a</sup>, Libor Havlíček <sup>b</sup>, Antonín Šturc <sup>a</sup>, Zuzana Skrášková <sup>a</sup>, Radek Jorda <sup>a</sup>, Tomáš Pospíšil <sup>a</sup>, Miroslav Strnad <sup>a</sup>, Vladimír Kryštof <sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Slechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic<sup>b</sup> Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany ASCR, Vídeňská 1083, 14220 Prague, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 October 2015

Received in revised form

8 January 2016

Accepted 9 January 2016

Available online 18 January 2016

## Keywords:

Cyclin-dependent kinase

Inhibitor

Selectivity

Bioisostere

## ABSTRACT

A series of 5-substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine derivatives was synthesized and evaluated for their cyclin-dependent kinase (CDK) inhibition activity. The most potent compounds contained various hydroxyalkylamines at the 5 position and possessed low nanomolar IC<sub>50</sub> values for CDK2 and CDK5. Preliminary profiling of one of the most active compounds on a panel of 50 protein kinases revealed its high selectivity for CDKs. The compounds arrested cells in S and G2/M phases, and induced apoptosis in various cancer cell lines. Significant dephosphorylation of the C-terminus of RNA polymerase II and focal adhesion kinase (FAK), well-established substrates of CDKs, has been found in treated cells. Cleavage of PARP-1, down-regulation of Mcl-1 and activation of caspases correlated well with CDK inhibition and confirmed apoptosis as the primary type of cell death induced in cancer cells treated with the compounds *in vitro*. A comparison of known purine-based CDK inhibitor CR8 with its pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine bioisosteres confirmed that the novel compounds are more potent in cellular assays than purines. Therefore, pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine may emerge as a novel scaffold in medicinal chemistry and as a source of potent CDK inhibitors.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Deregulation of the cell cycle is a common hallmark of cancers and, on the molecular level, is tightly linked to cyclin-dependent kinases (CDKs). Upon binding to regulatory subunits called cyclins, these enzymes play a key role in the cell cycle, from initiation, through DNA replication, to mitosis [1]. Deregulation of CDKs is often caused by amplification or overexpression of cyclins, or by mutation or silencing of the genes encoding natural protein inhibitors of CDKs. In principle, however, many various upstream alterations can hyperactivate CDKs inappropriately and, as a consequence, promote proliferation of cancer cells despite the lack of mitogens [2]. Besides that, deregulation of CDKs induces genomic and chromosomal instability that mediate neoplastic

transformation of cells [2].

Such observations in the vast majority of cancers provided a rationale for targeting CDKs using pharmacological inhibitors. The first small molecule CDK inhibitors, such as flavopiridol, roscovitine, and many others, demonstrated anti-proliferative and anti-cancer activity mediated by suppression of the expected targets. These targets comprised several CDK-family members including CDK1, CDK2, CDK4, CDK7, and CDK9 [3,4]. Both roscovitine and flavopiridol were therefore selected for clinical trials as anti-cancer drugs with a novel mechanism of action. However, both drugs exhibited toxicity and low efficacy. More potent compounds were developed soon afterward, and several were investigated in Phase II-III clinical trials [2].

Despite high sequence similarity within the CDK family, several truly monospecific CDK inhibitors were also identified, including CDK4-specific palbociclib [5], CDK7-specific irreversible binder THZ-1 [6], and CDK9-specific LDC000067 [7] (Fig. 1). Although it has proven necessary to inhibit several CDKs to produce anti-cancer activity in certain models, the abovementioned

Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; FAK, focal adhesion kinase.

\* Corresponding author.

E-mail address: [vladimir.krystof@upol.cz](mailto:vladimir.krystof@upol.cz) (V. Kryštof).



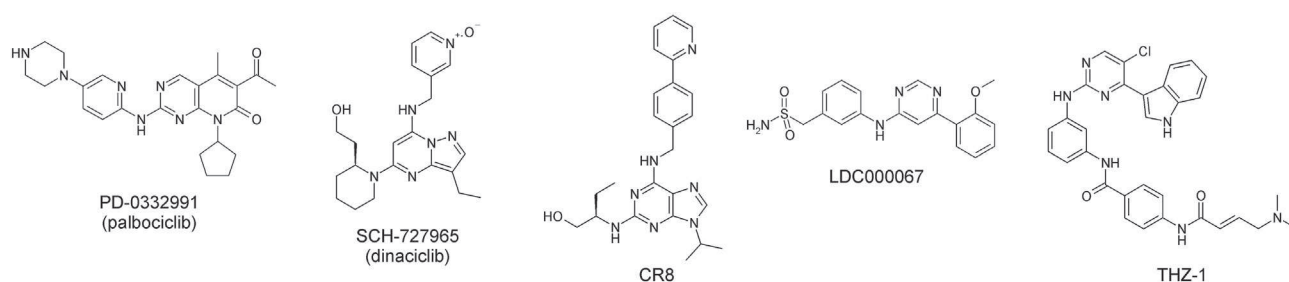


Fig. 1. Examples of known CDK inhibitors with varying selectivities.

palbociclib, with its higher selectivity for CDK4 and CDK6 than other CDKs, received accelerated FDA approval as the first compound in its class [8]. Palbociclib has shown efficacy in the treatment of certain breast cancers [9,10], but it becomes clear that other cancers will require different CDK selectivity patterns. Therefore, there is still a need for the development of new inhibitors.

We recently focused on the skeleton of pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine, an isostere of purine, and prepared a series of compounds substituted analogous to the purine-based roscovitine. To date, several other CDK inhibitors built on heterocycles isosteric to purine have been described (reviewed by Ref. [11]), but among them, only pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines, pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazines, and pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines exceed the activity of corresponding purines. Compounds based on the latter group, the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines, display anti-cancer activity [12,13]. In addition, some derivatives suppress abnormal proliferation related to the pathogenesis of restenosis in vascular smooth muscle cells [14] and tumor angiogenesis [15], all by inhibiting CDKs and aurora A kinase [13].

The objective of this work was to synthesize novel potent CDK inhibitors with a pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine scaffold bearing N6-biaryl substituents. N6-biaryl substituents were proven most advantageous for the activities of analogous purines, such as CR8, BP14, and others [16–19]. As we expected, the newly prepared derivatives displayed nanomolar potency against CDKs and cancer cell lines. The most potent derivative was over 7 times more active against CDK2 than CR8, and was comparable to another bioisostere of roscovitine, dinaciclib [20].

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis

The pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine substitutions were based on studies of structure-activity relationships for related purine and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine CDK inhibitors, and included one of the most beneficial biaryl amino substituents at position 7, *i.e.* [(2-pyridyl)benzyl]amine. Position 5 was modified using various side chains in order to understand the importance of each chain for activity. Products of position 5 modifications were also compared to the disubstituted derivative 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (**6**) that was prepared by reacting 7-chloro-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine [21] with 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine. Another simple derivative, 3-isopropyl-5-methylsulfanyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (**2a**) was prepared from 7-chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (**2**) by reaction with 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine.

The synthesis of 5-substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines (Scheme 1) was based on two subsequent nucleophilic substitutions. This synthesis

is analogous to the synthesis of the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine bioisostere of roscovitine [12]. However, contrary to the synthesis of the roscovitine analog, oxidation of the methylsulfanyl group of compound **2** must be performed before nucleophilic substitution of the chloro atom at position 7 in order to prevent oxidation of the pyridylbenzylamine part of the desired product. Substitution of the chloro atom of compound **3** proceeds under gentle conditions (60 °C/1 h) in a high yield. Subsequent substitution of the methylsulfanyl group of compound **4** needs severe conditions (125–150 °C/5–30 h) producing approximately 20% yield of derivatives **5**, which must be isolated by chromatography.

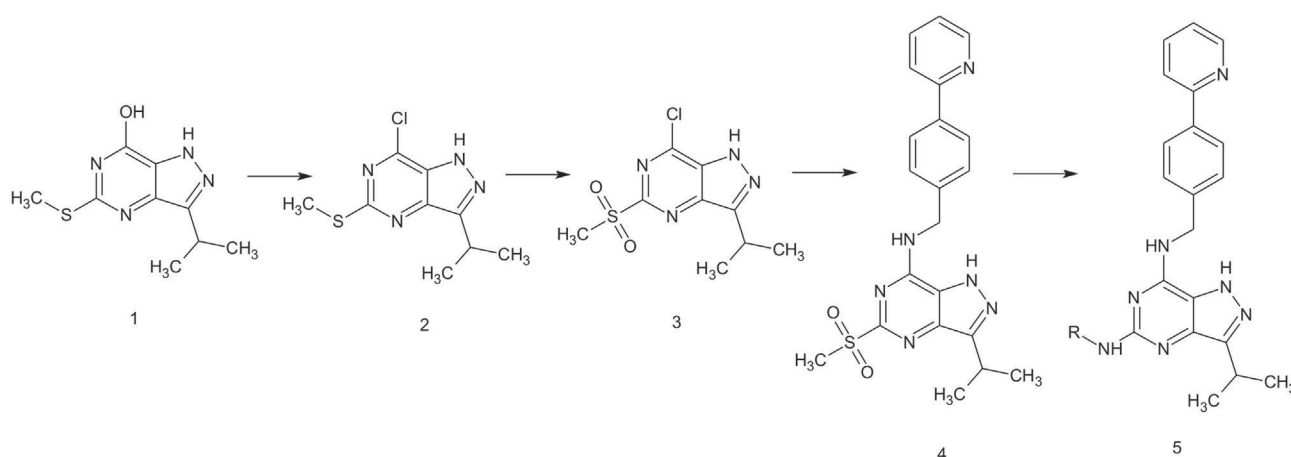
The structures of all newly-synthesized compounds were verified using NMR spectroscopy, ESI mass spectrometry, and elemental analysis. The purity of each synthesized compound was checked by HPLC-DAD analysis. Detailed information about synthesis and characterization of all compounds is described in the experimental and supporting information sections of this manuscript.

### 2.2. CDK inhibitory activity of novel pyrazolo [4,3-*d*]pyrimidines

The presence of a heterobiaryl substituent at position 6 of the purine molecule was proven crucial for CDK inhibitory activity, compared to monoaryl substituted derivatives like roscovitine [16,18,19]. This was clearly demonstrated by compound CR8 which showed a 3-fold lower IC<sub>50</sub> for CDK2, and >200-fold higher potency in cells than roscovitine [16].

We synthesized a collection of 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines with the same substitutions at positions 3 and 7 as CDK inhibitor CR8 and a different substitution at position 5. All novel derivatives were tested for CDK2/CDK5 kinase inhibition according to established protocols (see details in the Experimental section) and the data obtained are presented in Table 1.

The results demonstrate that most of the new compounds display significantly higher potency for inhibiting CDK2/CDK5 than the reference purine compound CR8, with IC<sub>50</sub> values well below 100 nM. The 3,7-disubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine **6**, lacking substitution at position 5, was slightly more active than CR8, suggesting that the biaryl function at 7 markedly increases affinity of the skeleton to a CDK. Addition of a suitable substitution at position 5 further increased potency. A small increase in potency of inhibition of either CDK2 or CDK5 (IC<sub>50</sub> values in a high nanomolar range) was observed when the scaffold was substituted, at position 5, with small sulphur-containing functions (**2a**, **4**). However the structures of most beneficial pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines with 5-substitutions, in terms of CDK inhibition, shared a hydroxyalkylamine or an aminoalkylamine motif (**5a–e**). This finding corresponds to earlier observations performed with analogous purine and pyrazolo[1,5-*a*]triazine inhibitors [18,19,22–24]. The most potent derivative, **5c**, showed IC<sub>50</sub> values for CDK2 and CDK5 of 9 nM and 1 nM, respectively. The activity of **5c** is comparable to clinically developed



**Scheme 1.** Preparation of 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines.

dinaciclib [20]. Only two newly-prepared derivatives, **5p** and **5q**, with aromatic chains at position 5, showed insufficient activity ( $IC_{50} > 1 \mu M$ ). One study shows that the aromatic substitution at 5 is detrimental for the activity of related purine inhibitors [23].

We also compared one of the most active compounds, **5b**, with several other known CDK inhibitors: pan-selective dinaciclib, CDK7-specific BS-181, and CDK4-specific palbociclib (Table 2). Compound **5b** displayed a similar profile and potency to those of dinaciclib, with a slightly lower potency against CDK1. Preliminary selectivity profiling of **5b** was then performed using a panel of 50 additional protein kinases. The compound was assayed at a single concentration of  $1 \mu M$ . As shown in the Supplementary Table S1, residual activity of other tested kinases reached values of approximately 50% (for CAMKKb) or 60% (for DYRK1A, CK1 $\delta$ , AMPK, PAK4), which clearly confirmed **5b** selectivity (extrapolated residual activities of CDK2 and CDK5 are <10%). It was not surprising that **5b** also inhibited PAK4 or CK1 $\delta$  because these kinases are sensitive to previously described pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines [13,14] and structurally related purines [16,25].

### 2.3. Activity in cancer cell lines

All novel derivatives were tested for cytotoxicity on four cancer cell lines (Table 1). Our data showed that the presence of substituents at position 5 rapidly increased cellular potency to nanomolar activities, compared to 3,7-disubstituted derivative **6**. While compound **6** displayed an  $IC_{50}$  of approximately  $1 \mu M$  for all cancer cell lines, other derivatives showed mid-level (**5f-h**, **5j-k**, **5m-o**) or low (**5a-e**, **5l**) nanomolar  $IC_{50}$  values. These activities clearly correspond with anti-CDK activity. All derivatives with high cytotoxicity also displayed high affinity for CDK2 and vice versa, whereas derivatives **5p** and **5q** were significantly less active in both assays. Surprisingly, replacing hydroxyalkylamines with cyclic amines usually weakens cellular potency ( $IC_{50}$  values of **5f-h**, **5j**, **5n**, **5o** >  $100 nM$ ), although CDK inhibition in biochemical assays still occurred at a low nanomolar range. The most potent pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines, **5a-c** and **5l**, each showed an  $IC_{50}$  that was at least 10-fold lower than that of CR8.

Next, the activity of **5b**, one of the most potent inhibitors in the series of compounds, was studied in detail in a colon carcinoma cell line, HCT-116. As shown in Fig. 2A, treatment with  $125 nM$  and higher concentrations of **5b** substantially decreased the S-phase population (BrdU-positive cells) of cells, increased the subG1 population (apoptotic cells), and arrested cells in late S and G2/M phases. In addition, similar effects were observed in breast

adenocarcinoma cells, MCF-7, treated with **5b** and other pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines, compared to cells treated with CR8 (the control; Fig. S1). These results indicate that the compounds block DNA replication and proliferation in a dose-dependent manner, an effect attributable to CDK2 inhibition. Similar outcomes have been described for numerous other CDK inhibitors, such as roscovitine, dinaciclib, SNS032, and flavopiridol [20,26–28].

Due to structural similarities between CDK2 and CDK5, it was no surprise that the compounds inhibited both kinases (Table 1). Because CDK5 emerged as a new potential target of cancer therapy, we attempted to show that compound **5b** also targets CDK5 in cells. We immunoblotted lysates of treated HCT-116 cells and discovered a dose-dependent decrease of FAK phosphorylation at Ser 732 (Fig. 2B), which is a known CDK5 substrate [29,30].

Due to the strong cytotoxicity of **5b** in the HCT-116 cell line, we sought to identify the type of cell death that occurs, using biochemical assays. Lysates of treated HCT-116 cells were subjected to immunoblotting. Subsequent analysis revealed a dose-dependent decrease of anti-apoptotic protein Mcl-1 as well as cleavage of PARP-1, a known caspase substrate (Fig. 3A). We also found that **5b** rapidly increased the expression of tumor suppressor p53 at concentrations of  $250 nM$  and higher. In addition, caspase activation in treated cells was confirmed by an enzymatic assay, using fluorescently labeled substrates of caspases 3 and 7 (Fig. 3B) that revealed clear dose-dependent responses in a sub-micromolar range.

Although CDK2 is dispensable for the growth of most tumors [31], some articles showed that CDK2 might be a suitable target for molecular therapy of primary and metastatic melanoma [32]. Indeed, the anti-melanoma activity of CDK inhibitors dinaciclib and roscovitine has been confirmed [33–35]. We therefore studied the effects of novel derivatives in a melanoma cancer cell line, G361. The tested derivatives potently activated caspases in treated cells (Supplemental Fig. S2). Moreover, ongoing apoptosis (as evidenced by immunoblotting of cleaved PARP-1 and decreased Mcl-1 levels) correlated well with reduced phosphorylation of RNA polymerase II at the C-terminus (Supplemental Fig. S3 and S4). Importantly, the tested derivatives induced cancer cell death in substantially lower doses than related purine derivative CR8 and pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine bioisostere of roscovitine (designated as compound 7) [12].

### 3. Conclusion

A library of 20 novel pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine derivatives,

**Table 1**  
Cytotoxicity and anti-CDK activity of novel 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines.




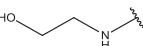
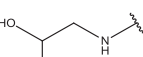
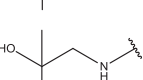
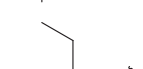
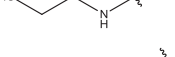
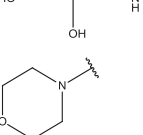
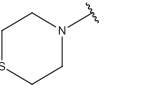
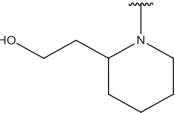
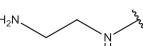

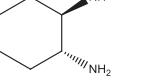
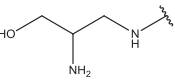
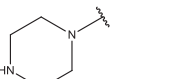
Compound	R	IC <sub>50</sub> (μM)				Kinases	
		Cancer cell lines				CDK2	CDK5
		K-562	MCF-7	G361	HCT-116		
<b>Roscovitine</b>	n.a.	45.5	12.25	22.4	14.42	0.158	1.069
<b>CR8</b>	n.a.	0.175	0.160	0.503	0.350	0.062	0.225
<b>6</b>		1.000	1.190	0.875	1.237	0.197	0.183
<b>2a</b>		0.778	0.819	1.400	2.800	0.048	0.229
<b>4</b>		0.640	0.460	0.793	1.140	0.070	0.165
<b>5a</b>		0.038	0.051	0.039	0.027	0.031	0.049
<b>5b</b>		0.057	0.027	0.040	0.087	0.021	0.005
<b>5c</b>		0.029	0.024	0.048	0.085	0.009	0.001
<b>5d</b>		0.070	0.053	0.067	0.110	0.054	0.009
<b>5e</b>		0.047	0.059	0.072	0.087	0.012	0.021
<b>5f</b>		0.110	0.163	0.197	0.270	0.018	0.005
<b>5g</b>		0.589	0.530	0.873	0.940	0.061	0.114
<b>5h</b>		0.165	0.133	0.204	0.142	0.024	0.037
<b>5i</b>		0.063	0.062	0.230	0.227	0.018	0.008
<b>5j</b>		0.175	0.295	0.477	0.427	0.046	0.044
<b>5k</b>		0.700	0.310	1.018	0.781	0.051	0.017
<b>5l</b>		0.017	0.021	0.064	0.088	0.050	0.119
<b>5m</b>		0.125	0.225	0.640	0.390	0.467	2.136

Table 1 (continued)

		IC <sub>50</sub> , (μM)					
		Cancer cell lines				Kinases	
Compound	R	K-562	MCF-7	G361	HCT-116	CDK2	CDK5
<b>5n</b>		0.593	0.474	0.745	0.720	0.096	0.179
<b>5o</b>		0.145	0.195	0.181	0.350	0.132	0.422
<b>5p</b>		3.950	5.300	7.487	17.40	1.483	4.415
<b>5q</b>		2.535	2.385	3.610	7.325	1.450	3.600

**Table 2**  
CDK selectivity profile of Compound **5b** and some known CDK inhibitors (assayed as controls).

Kinases	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>			
	Cmpd. <b>5b</b>	Dinaciclib	BS-181	Palbociclib
CDK1	0.777	0.072	14.0	>10
CDK2	0.021	0.002	1.80	9.20
CDK4	>2	0.127	44.7	0.016
CDK5	0.034	0.045	3.70	>10
CDK7	2.780	n.a.	0.134	>10
CDK9	0.240	0.178	2.18	0.892

<sup>a</sup> Average values from at least three determinations.

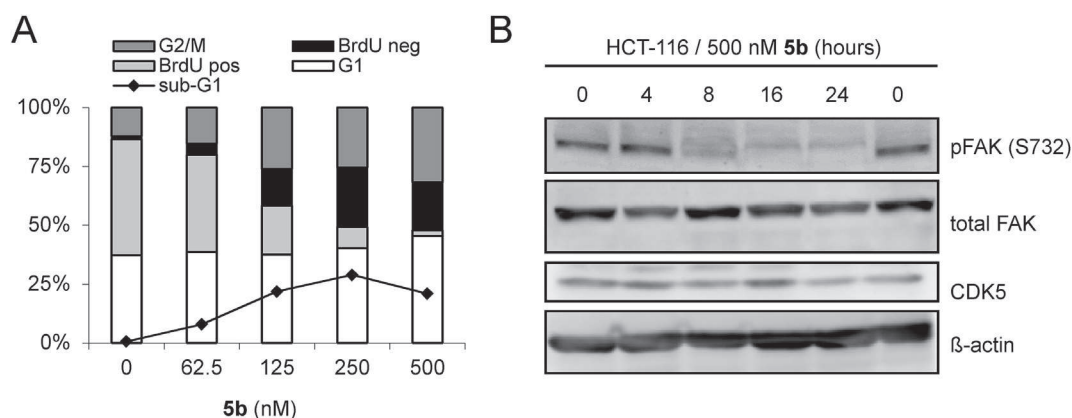
with nanomolar inhibitory activities against CDK2 and CDK5, was generated. The majority of compounds demonstrated strong anti-proliferative effects, including cell cycle arrest and induction of apoptosis, for which CDK inhibition is a primary mode of action. Although the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine is isosteric to purine and

pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine and the new compounds are analogous to roscovitine and dinaciclib, we found that pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines were substantially more active than purines. This scaffold may serve as an alternative source of novel, potent CDK inhibitors that may display different physico-chemical and pharmacological properties. Therefore, pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine may emerge as a novel scaffold in medicinal chemistry and is worth further investigation, especially in the field of cancer therapeutics, where drug resistance significantly complicates efficacy.

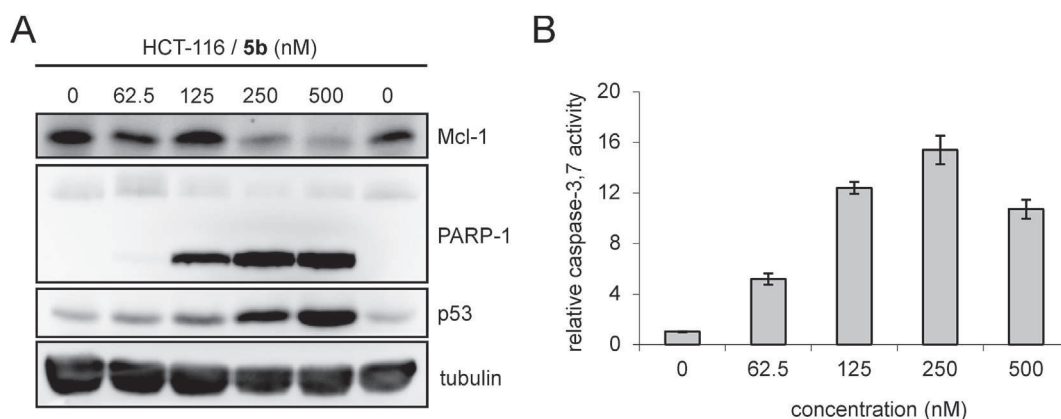
## 4. Experimental section

### 4.1. Chemistry

NMR spectra were recorded on a JEOL ECA-500 spectrometer operating at frequencies of 500.16 MHz (<sup>1</sup>H) and 125.76 MHz (<sup>13</sup>C). <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts were referenced to the solvent signals; <sup>1</sup>H: δ(residual CHCl<sub>3</sub>) = 7.25 ppm, δ(residual DMSO-



**Fig. 2.** Effect of **5b** on the HCT-116 cancer cell line. (A) Asynchronous cells were treated with different concentrations of **5b** for 24 h. The cell cycle was analyzed by flow cytometry; DNA was double-labeled with propidium iodide and 5-bromo-2'-deoxyuridine. (B) Time-course immunoblotting analysis of phosphorylation of FAK, a known CDK5 substrate, in cells treated with 500 nM of **5b**. β-actin was detected to verify equal loading.



**Fig. 3.** Induction of apoptosis in HCT-116 cancer cells treated with different doses of **5b** for 24 h. (A) Immunoblotting analysis of apoptosis-related proteins in treated cells. Tubulin levels were detected to verify equal loading. (B) Fluorimetric assay for caspase-3 and caspase-7 activity in lysates prepared from treated cells. Caspase activity was measured using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC and normalized against untreated control cell lysates.

$d_5$ ) = 2.50 ppm,  $\delta(\text{residual CD}_2\text{HOD})$  = 3.31 ppm;  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3)$  = 77.23 ppm,  $\delta(\text{DMSO}-d_6)$  = 39.52 ppm,  $\delta(\text{CD}_3\text{OD})$  = 49.15 ppm. Chemical shifts are given in  $\delta$  scale [ppm] and coupling constants in Hz.

Melting points were determined on a Kofler block and are uncorrected. Reagents were of analytical grade and from standard commercial sources. Thin layer chromatography (TLC) was carried out using aluminium sheets with silica gel F<sub>254</sub> from Merck. Spots were visualized under UV light (254 nm). ESI mass spectra were determined using a Waters Micromass ZMD mass spectrometer (solution in MeOH, direct inlet, coin voltage 20 V). Column chromatography was performed using Merck silica gel Kieselgel 60 (230–400 mesh). The purity of all synthesized compounds was determined by HPLC-PDA (200–500 nm). Specific optical rotation was measured on polarimeter polAAR 3001 (wave length: 589.44 nm, tube length: 5 cm, and  $t$  = 23 °C). All compounds gave satisfactory elemental analyses (0.4%).

#### 4.1.1. 3-Isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-ol (**1**)

This compound was prepared as previously described [12].

#### 4.1.2. 7-Chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**2**)

This compound was prepared as previously described [12].

#### 4.1.3. 3-Isopropyl-5-methylsulfanyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**2a**)

A solution of 7-Chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**2**) (0.56 g, 2.3 mmol), 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine (0.48 g, 2.6 mmol) and ethyldiisopropylamine (0.86 mL, 5 mmol) in 12 mL t-BuOH was heated with stirring at 70 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with magnesium sulfate and evaporated. Crystallization from CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O generated a colorless product with m.p. = 170–173 °C, mass = 0.79 g, and 87% yield. ESI +  $m/z$  391.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI-  $m/z$  389.1 [M-H]<sup>-</sup>.  $^1\text{H}$  (500 MHz; DMSO- $d_6$ ): 1.36 (d,  $J$  = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.43 (s, 3H, -SCH<sub>3</sub>); 3.31–3.35 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.75 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.32 (ddd,  $J$  = 7.34 Hz,  $J$  = 4.89 Hz,  $J$  = 0.92 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d,  $J$  = 7.03 Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt,  $J$  = 7.64 Hz,  $J$  = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.92 (d,  $J$  = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.05 (bd,  $J$  = 7.03 Hz, 2H, ArH); 8.63 (bd,  $J$  = 4.58 Hz, 1H, ArH). Anal. (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>S) C, H, N, S.

#### 4.1.4. 7-Chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**3**)

Oxone<sup>R</sup> solution (monopersulfate comp., Aldrich Cat: 228036, 36 g) in water (180 mL) was added in a dropwise manner, within 1 h, to a solution of 7-chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**2**) (10 g, 41.3 mmol) in EtOH (180 mL) at 55 °C. The reaction mixture was stirred for another hour at 60 °C. After cooling to room temperature, the EtOH was removed by evaporation and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and EtOAc. The combined organic phase was dried with sodium sulfate. Crystallization from EtOAc/Et<sub>2</sub>O generated a product with m.p. = 111–114 °C, mass = 9.17 g, and 81% yield. ESI-  $m/z$  273.1 [M-H]<sup>-</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.49 (d,  $J$  = 6.96, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.58 (sep,  $J$  = 6.96, 1H, CH). Anal. (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S) C, H, N, S.

#### 4.1.5. 3-Isopropyl-5-methylsulfanyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**)

A mixture of 7-Chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**3**) (4.89 g, 17.8 mmol) and ethyldiisopropylamine (4 mL, 22.5 mmol) were heated with stirring in 80 mL t-BuOH at 60 °C. A solution of 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine (3.84 g, 20.9 mmol) in 30 mL t-BuOH (50 °C) was added and the reaction mixture was heated at 60 °C for 1 h. The product started to crystallize after 10 min. After cooling at room temperature, the product was filtered off, washed with MeOH and dried under vacuum; the product had m.p. = 214–218 °C, mass = 6.4 g, and 85% yield. ESI +  $m/z$  423.3 [M+H]<sup>+</sup>, ESI-  $m/z$  421.3 [M-H]<sup>-</sup>.  $^1\text{H}$  (500 MHz; DMSO- $d_6$ ): 1.38 (d,  $J$  = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.31–3.35 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.82 (bs, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-); 7.30–7.32 (m, 1H, ArH); 7.53 (d,  $J$  = 7.00 Hz, 2H, ArH); 7.82–7.86 (m, 1H, ArH); 7.91–7.92 (m, 1H, ArH); 8.05 (bs, 2H, ArH); 8.63 (bd,  $J$  = 4.28 Hz, 1H, ArH). Anal. (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S) C, H, N, S.

#### 4.1.6. 3-Isopropyl-5-(2-hydroxyethyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5a**)

A solution consisting of 3-isopropyl-5-methylsulfanyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.20 g, 0.48 mmol) and ethanolamine (4 mL, 66 mmol) was heated in a sealed ampoule at 130 °C for 25 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography: stepwise (5%, 6%, 8%, 10%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub> containing a trace of concentrated aqueous

NH<sub>4</sub>OH. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.10 g, and 51% yield. ESI + *m/z* 404.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI- *m/z* 402.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.18 (d, *J* = 7.07 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.09 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.41 (bs, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3.69 (bs, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 4.57 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.12 (qd, *J* = 7.64 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 1.22 Hz, 1H, ArH); 7.21 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.52 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.62 (td, *J* = 7.34 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.72 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.54 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 21.4, 25.9, 43.9, 45.3, 64.3, 120.6, 122.1, 127.0, 127.8, 136.9, 138.1, 138.8, 149.3, 152.3, 156.8, 158.2. Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N.

#### 4.1.7. 3-Isopropyl-5(R)-(2-hydroxypropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5b**)

A solution consisting of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (1.25 g, 2.96 mmol) in R(-)-1-amino-2-propanol (10 mL, 110 mmol) in a sealed ampoule was heated at 130 °C for 12 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 60 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (3%, 5%, 7%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub> containing a trace of concentrated aqueous NH<sub>4</sub>OH. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.65 g, and 52% yield. ESI + *m/z* 418.1 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 209.6 (20%) [M+2H]<sup>2+</sup>, ESI- *m/z* 416.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>): 0.99 (d, *J* = 6.42 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1.27 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.06–3.11 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3.20–3.23 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.72–3.75 (m, 1H, -CH-); 4.69 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 6.02 (bs, 1H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.27–7.30 (m, 1H, ArH); 7.45 (d, *J* = 7.34 Hz, 2H, ArH); 7.63 (bs, 1H, -NH-); 7.82 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.88–7.89 (m, 1H, ArH); 8.01 (s, 2H, ArH); 8.60 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, ArH); 11.76 (bs, 1H, -NH-). <sup>13</sup>C (125 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>): 21.9, 22.2, 26.6, 43.4, 49.9, 66.7, 120.5, 122.8, 127.2, 128.4, 137.7, 149.8, 156.3. Anal. (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 2.6° (MeOH, *c* = 5 mg/mL, 23 °C).

#### 4.1.8. 3-Isopropyl-5-(2-hydroxy-2-methylpropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5c**)

A mixture of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.6 g, 1.42 mmol) and 1-amino-2-methyl-2-propanol (1.25 g, 14 mmol) was heated at 150 °C for 15 h in a sealed ampoule. After cooling, the reaction mixture was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (3%, 5%, 7%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass form, with 0.2 g, and 33% yield. ESI + *m/z* 432.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI- *m/z* 430.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.06 (s, 6H, (OH)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.29 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.14 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.20 (d, *J* = 5.81 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 4.73 (d, *J* = 4.89 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 6.12 (bs, 1H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.31 (dd, *J* = 7.03 Hz, *J* = 5.50 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.04 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, ArH); 8.63 (d, *J* = 4.28 Hz, 1H, ArH). Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N.

#### 4.1.9. 3-Isopropyl-5(R)-[1-(hydroxymethyl)propyl]amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5d**)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.5 g, 1.19 mmol) in R(-)-2-amino-1-butanol (5 mL, 50 mmol) was

heated at 150 °C for 15 h in a sealed ampoule. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (3%, 5%, 7%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.14 g, and 27% yield. ESI + *m/z* 432.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI- *m/z* 430.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.81 (t, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 1.39–1.45 (m, 7H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH $\alpha$ -CH<sub>3</sub>); 1.55–1.59 (m, 1H, -CH $\beta$ -CH<sub>3</sub>); 3.43–3.47 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.77–3.80 (m, 1H, -CH-NH-); 4.49–4.67 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-OH, -NH-CH<sub>2</sub>-); 5.82 (d, *J* = 7.64 Hz, 1H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.29–7.31 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.78 (s, 1H, NH); 7.83 (t, *J* = 8.01 Hz, 1H, ArH); 7.89 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.99 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.62 (bd, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH). Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = + 45.5° (MeOH, *c* = 1.9 mg/mL, 23 °C).

#### 4.1.10. 3-Isopropyl-5-(2,3-dihydroxypropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5e**)

A mixture of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzylamino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.20 g, 0.47 mmol), and 2,3-dihydroxypropylamine (2 mL, 26 mmol) was heated at 125 °C for 20 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (3%, 5%, 8%, and 10%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.05 g, and 25% yield. ESI + *m/z* 434.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI- *m/z* 432.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.29 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.85–1.91 (m, 1H, -CH $\alpha$ H $\beta$ -); 2.16 (t, *J* = 8.25 Hz, 1H, -CH $\alpha$ H $\beta$ -); 3.14–3.16 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.20–3.34 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3.54–3.56 (m, 1H, -CH-); 4.72 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 6.18 (bs, 1H, -NH-); 7.32 (dd, *J* = 6.72 Hz, *J* = 5.50 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, *J* = 7.34 Hz, 2H, ArH); 7.85 (td, *J* = 7.79 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.03 (bs, 2H, ArH); 8.63 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, ArH); 11.85 (bs, 1H, -NH-). <sup>13</sup>C (125 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 17.2, 21.7, 30.2, 42.7, 44.8, 48.5, 63.5, 71.9, 120.2, 122.5, 126.6, 128.0, 137.3, 149.6, 155.8. Anal. (C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>) C, H, N.

#### 4.1.11. 3-Isopropyl-5-(N-morpholinyl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**5f**)

A mixture of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.36 g, 0.85 mmol) and morpholine (3 mL, 27 mmol) in a sealed ampoule was heated at 150 °C for 8 h. Excess morpholine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (2%, 4%, 5%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.15 g, and 41% yield. ESI + *m/z* 430.1 [M+H]<sup>+</sup>, ESI- *m/z* 428.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.32 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.18 (bs, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.58–3.60 (bs, 8H, 4 $\times$ -CH<sub>2</sub>-); 4.74 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.31 (dd, *J* = 6.72 Hz, *J* = 5.50 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.78 (bs, 1H, -NH-); 7.84 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.04 (d, *J* = 5.81 Hz, 2H, ArH); 8.63 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, ArH); 11.84 (bs, 1H, -NH-). Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N.

#### 4.1.12. 3-Isopropyl-5-(thiomorpholinyl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5g)

A mixture of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.2 g, 0.47 mmol) and thiomorpholine (3 mL, 29 mmol) in a sealed ampoule was heated at 150 °C for 5 h. Excess thiomorpholine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (2%, 3%, 4%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous yellow glass foam, with mass = 0.05 g, and 24% yield. ESI + *m/z* 446.1 [M+H]<sup>+</sup>, ES- *m/z* 444.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.55–2.57 (m, 4H, 2 × -CH<sub>2</sub>-); 3.30 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.07–4.09 (m, 4H, 2 × -CH<sub>2</sub>-); 4.64 (bd, *J* = 5.20 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.17–7.20 (m, 1H, ArH); 7.28 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.60 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.69 (dt, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.79 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.60–8.62 (m, 1H, ArH). Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>S) C, H, N, S.

#### 4.1.13. 3-Isopropyl-5-[2-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5h)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.20 g, 0.47 mmol) and 2-piperidineethanol (2.3 mL, 19 mmol) was heated in a sealed ampoule at 130 °C for 35 h. Excess amine was evaporated (0.2 torr, 85 °C) and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and dichloromethane. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (4%, 6%, 8%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.022 g, and a 10% yield. ESI + *m/z* 472.2 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 236.7 (90%) [M+2H]<sup>2+</sup>, ES- *m/z* 470.2 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.19 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.41–1.44 (m, 1H); 1.55–1.76 (m, 5H); 2.01–2.17 (m, 1H); 2.77 (bt, 1H); 3.06 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.40 (bt, 1H); 3.67–3.69 (bs, 1H); 4.59 (bs, 1H); 4.70–4.76 (m, 3H); 7.16–7.18 (m, 1H, ArH); 7.40 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.60 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, ArH); 7.68 (td, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.81 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.60–8.61 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 19.5, 20.9, 21.6, 25.4, 25.8, 29.6, 29.7, 31.9, 40.1, 44.3, 48.5, 57.8, 120.2, 122.1, 126.9, 128.2, 136.8, 138.2, 139.0, 149.4, 151.3, 156.0, 157.0. Anal. (C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O) C, H, N.

#### 4.1.14. 3-Isopropyl-5-(2-aminoethyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5i)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.3 g, 0.71 mmol) and 2-aminoethylamine (10 mL, 150 mmol) in a sealed ampoule was heated at 125 °C for 20 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (6%, 8%, 11%, 13%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub> with a trace of concentrated aqueous NH<sub>4</sub>OH. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.16 g, and 56% yield. ESI + *m/z* 403.1 [M+H]<sup>+</sup>, ES- *m/z* 401.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.27 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.79 (t, *J* = 5.50 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3.21 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.39 (bs, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 4.58 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 5.07 (bs, 1H, -NH-); 7.14–7.17 (m, 1H, ArH); 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.57 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.66 (td,

*J* = 7.95 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.74 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.58 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 21.7; 25.8; 42.0; 43.8; 44.6; 120.7; 122.2; 127.0; 127.9; 136.9; 138.1; 139.5; 149.4; 152.1; 157.0; 158.6. Anal. (C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>) C, H, N.

#### 4.1.15. 3-Isopropyl-5-(trans-2-aminocyclohexyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5j)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (1.4 g, 3.32 mmol) in *trans*-1,2-diaminocyclohexane (30 mL, 68 mmol) was heated in a sealed ampoule at 150 °C for 20 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (4%, 8%, 11%, 14%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub> containing a trace of concentrated aqueous NH<sub>4</sub>OH. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.20 g, and 13% yield. ESI + *m/z* 457.3 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 229.1 (50%) [M+2H]<sup>2+</sup>, ES- *m/z* 455.3 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.13–1.20 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-); 1.25 (bs, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.57–1.59 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 1.86 (bs, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2.47 (bs, 1H, >CHNH<sub>2</sub>); 3.15 (sept., *J* = 6.42 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.56 (bs, 1H, -CHNH<sub>2</sub>); 4.57 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.13 (dd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.89 Hz, 1H, ArH); 7.28 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, Ar); 7.53 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.63 (d, *J* = 7.64 Hz, 1H, ArH); 7.73 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 8.58 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH). <sup>13</sup>C (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 18.3; 21.7; 21.8; 24.7; 25.0; 25.9; 32.5; 34.0; 43.7; 46.0; 56.3; 57.2; 57.9; 120.4; 121.9; 126.8; 127.0; 127.4; 127.7; 136.7; 137.9; 139.6; 149.3; 149.6; 151.8; 156.9; 158.0. Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>8</sub>) C, H, N.

#### 4.1.16. 3-Isopropyl-5-(3-amino-2-hydroxypropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5k)

A mixture of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.69 g, 1.64 mmol), 1,3-diamino-2-propanol (10 mL, 95 mmol) and 1-methyl-2-pyrrolidone 2 mL was heated at 140 °C for 12 h in a sealed ampoule. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O and CHCl<sub>3</sub>. The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (5%, 8%, 11% 14%) with MeOH in CHCl<sub>3</sub> containing a trace of concentrated aqueous NH<sub>4</sub>OH. Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystalizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.17 g, and 24% yield. ESI + *m/z* 433.1 (100%) [M+H]<sup>+</sup>, 217.6 (90%) [M+2H]<sup>2+</sup>, ES- *m/z* 431.1 [M - H]<sup>-</sup>. <sup>1</sup>H (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.27 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.40–2.50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 3.10–3.20 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2.28–2.33 (m, 1H, -CH(OH)-); 3.45–3.49 (m, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.69 (bs, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 6.06 (app. bt, 1H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 7.26–7.29 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.81 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.87–7.89 (m, 2H, ArH, -NH-); 8.01 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, ArH); 8.59–8.60 (m, 1H). <sup>13</sup>C (125 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 22.1, 22.2, 26.2, 43.1, 45.7, 46.0, 72.8, 120.6, 123.0, 126.7, 127.0, 127.8, 128.4, 137.7, 137.9, 140.9, 150.0, 156.3, 158.9. Anal. (C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O) C, H, N.

#### 4.1.17. 3-Isopropyl-5-(piperazin-1-yl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5l)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.32 g, 0.76 mmol) in piperazine (3 mL, 27 mmol) in a sealed ampoule was heated at 150 °C for 6 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C and the residue was partitioned between H<sub>2</sub>O

and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (2%, 4%, 5%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$  containing a trace of concentrated aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a non-crystallizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.18 g, and 55% yield. ESI +  $m/z$  429.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ES-  $m/z$  427.1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.31 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.73–2.75 (m, 4H,  $2\times-\text{CH}_2-$ ); 3.17 (sept.,  $J = 7.03$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.58–3.60 (m, 4H,  $2\times-\text{CH}_2-$ ); 4.71 (d,  $J = 5.20$  Hz, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 7.29 (ddd,  $J = 7.34$  Hz,  $J = 4.89$  Hz,  $J = 0.92$  Hz, 1H, ArH); 7.48 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt,  $J = 7.49$  Hz,  $J = 1.53$  Hz, 1H, ArH); 7.91 (d,  $J = 8.25$  Hz, 1H, ArH); 8.04 (d,  $J = 7.64$  Hz, 2H, ArH); 8.63 (d,  $J = 4.58$  Hz, 1H, ArH). Anal. ( $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_8$ ) C, H, N.

#### 4.1.18. 3-Isopropyl-5-[2-(dimethylamino)ethyl]amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5m)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.3 g, 0.71 mmol) and 2-(dimethylamino)ethylamine (3 mL, 27 mmol) in a sealed ampoule was heated at 140 °C for 5 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 50 °C, and the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (5%, 10%, 14%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$  containing a trace of concentrated aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Chromatography provided a noncrystallizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.06 g, and 20% yield. ESI +  $m/z$  431.2 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 216.1 (30%)  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ES-  $m/z$  429.2  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 1.31 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.23 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ ); 2.65 (t,  $J = 7.64$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 3.20 (t,  $J = 7.34$ , 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 3.27 (kvint.,  $J = 7.03$  Hz, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.61 (bs, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 6.97 (bs, 1H,  $-\text{NH}-\text{CH}-$ ); 7.14–7.18 (m, 3H, ArH); 7.55 (d,  $J = 8.25$  Hz, 1H, ArH); 7.66 (dd,  $J = 7.64$  Hz,  $J = 1.83$  Hz, 1H, ArH); 7.69 (d,  $J = 7.95$  Hz, 2H, ArH); 8.55 (d,  $J = 3.97$  Hz, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 21.8; 26.4; 28.1; 44.0; 45.1; 59.1; 120.9; 122.3; 127.1; 128.0; 137.2; 138.2; 139.1; 149.4; 150.7; 157.0; 161.7. Anal. ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_8$ ) C, H, N.

#### 4.1.19. 3-Isopropyl-5-(trans-4-aminocyclohexyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5n)

3-Isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.3 g, 0.71 mmol) in melted *trans*-1,4-diaminocyclohexane (5 g, 44 mmol) was heated in a sealed ampoule at 150 °C for 20 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (4%, 8%, 11%, 14%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$  containing a trace of concentrated aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystallizable, amorphous colorless glass foam, with mass = 0.06 g, and 19% yield. ESI +  $m/z$  457.3 (100%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 229.1 (50%)  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ES-  $m/z$  455.3  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.08–1.18 (m, 4H,  $2\times-\text{CH}_2-$ ); 1.27 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.71–1.72 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 1.85–1.87 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2.50–2.52 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{NH}-$ ); 3.11 (sept.,  $J = 7.03$  Hz, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.54–3.56 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{NH}-$ ); 4.68 (bd,  $J = 4.58$  Hz, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 5.69 (bd,  $J = 7.34$  Hz, 1H,  $-\text{NH}-\text{CH}-$ ); 7.26 (m, 1H, ArH); 7.44 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH); 7.79–7.82 (m, 2H, ArH, and  $-\text{NH}-$ ); 7.86–7.88 (m, 1H, ArH); 8.00 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH); 8.59–8.60 (m, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 22.1; 26.4, 31.8, 34.9, 43.2, 50.0, 50.4, 120.6, 122.9, 127.0, 128.3, 137.7, 137.8, 141.2, 150.0, 156.3, 157.8. Anal. ( $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_8$ ) C, H, N.

#### 4.1.20. 3-Isopropyl-5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5o)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.21 g, 0.5 mmol) and 2-piperazin-1-ylethanol (3 mL, 23 mmol) in a sealed ampoule was heated at 150 °C for 5 h. The reaction mixture was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (2%, 3%, 4%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$ . Chromatography provided a syrupy product that crystallized from  $\text{CHCl}_3$ , with m.p. = 135–140 °C, mass = 0.035 g, and 15% yield. ESI +  $m/z$  473.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ES-  $m/z$  471.1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$ ): 1.23 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.45–2.46 (m, 6H,  $3\times-\text{CH}_2-$ ); 3.14 (sept.,  $J = 6.72$  Hz, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.50–3.52 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 3.67 (m, 4H,  $2\times-\text{CH}_2-$ ); 4.60–4.61 (m, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 7.05–7.09 (m, 1H, ArH); 7.18 (bs, 1H,  $-\text{NH}-$ ); 7.31–7.32 (m, 2H, ArH); 7.54–7.59 (m, 2H, ArH); 7.78–7.79 (m, 2H, ArH); 8.47–8.48 (m, 1H, ArH); 11.3 (bs, 1H,  $-\text{NH}-$ ).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$ ): 21.6, 26.5, 44.0, 44.6, 52.9, 57.7, 59.8, 120.3, 122.2, 126.9, 128.4, 136.8, 138.3, 140.0, 149.6, 156.7, 157.9. Anal. ( $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}$ ) C, H, N.

#### 4.1.21. 3-Isopropyl-5-(4-methoxybenzyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5p)

A solution of 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.5 g, 1.18 mmol) in 4-methoxybenzylamine (10 mL, 58 mmol) was heated in a sealed ampoule at 150 °C for 5 h. Excess amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography, stepwise (3%, 5%, 7%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$ . Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystallizable, amorphous colorless glass, with mass = 0.15 g, and 26% yield. ESI +  $m/z$  480.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ES-  $m/z$  478.3  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 1.29 (d,  $J = 6.72$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.21 (sept.,  $J = 6.72$  Hz, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.67 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4.50 (bd,  $J = 3.97$  Hz, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 4.69 (bs, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 6.72 (d,  $J = 8.56$  Hz, 2H, ArH); 7.17–7.22 (m, 3H, ArH,  $-\text{NH}-$ ); 7.29 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH); 7.59 (d,  $J = 7.95$  Hz, 1H, ArH); 7.69 (dt,  $J = 7.64$  Hz,  $J = 1.83$  Hz, 1H, ArH); 7.78 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH); 8.60–8.61 (m, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 21.8, 26.1, 44.2, 45.4, 55.3, 113.8, 120.7, 122.3, 127.1, 128.1, 128.4, 128.9, 129.0, 137.4, 138.4, 149.6, 157.0, 158.7. Anal. ( $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}$ ) C, H, N.

#### 4.1.22. 3-Isopropyl-5,7-di[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (5q)

A mixture of 3-Isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**4**) (0.25 g, 0.59 mmol), 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine (0.48 g, 2.6 mmol), ethyldiisopropylamine (0.4 mL, 2.3 mmol) and 1-methyl-2-pyrrolidone 1 mL was heated at 150 °C for 5 h in a sealed ampoule. The reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with sodium sulfate. The product was purified by column chromatography, stepwise (4%, 6%, 8%, 10%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$  containing a trace of concentrated aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Chromatography provided (after evaporation under vacuum) a noncrystallizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.069 g, and 21% yield. ESI +  $m/z$  527.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ES-  $m/z$  525.3  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.30 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.22–3.27 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.62 (bs, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 4.73 (d,  $J = 5.81$  Hz, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 7.27–7.37 (m, 6H, ArH); 7.74–7.77 (m, 4H, ArH); 7.91–7.93 (m, 4H, ArH); 8.59–8.60 (m, 2H, ArH). Anal. ( $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_8$ ) C, H, N.



#### 4.1.23. 3-Isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (**6**)

A solution of 7-chloro-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (Moravcova 2003), 1-[4-(pyridin-2-yl)phenyl]methanamine (0.31 g, 1.58 mmol) and ethyldiisopropylamine (0.4 mL, 2.3 mmol) in  $\text{CHCl}_3/\text{t-BuOH}$  (6 mL/1 mL) was heated for 1 h at 60 °C. After cooling to room temperature the reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was partitioned between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CHCl}_3$ . The combined organic phase was dried with magnesium sulfate and evaporated. Column chromatography, stepwise (1%, 2%, and 4%) with MeOH in  $\text{CHCl}_3$  provided (after evaporation under vacuum) a noncrystallizable, amorphous colorless glass form, with mass = 0.442 g, and 81% yield. ESI +  $m/z$  345.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ESI-  $m/z$  343.1  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1.33 (d,  $J = 7.03$  Hz, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3.29 (m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 4.78 (bs, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ); 7.27–7.29 (m, 1H, ArH); 7.46 (d,  $J = 7.03$  Hz, 2H, ArH); 7.80–7.83 (m, 1H); 7.87–7.89 (m, 2H, ArH, and  $-\text{NH}-$ ); 8.03 (d,  $J = 7.03$  Hz, 2H, ArH); 8.21 (bs, 1H, ArH, HC5); 8.60 (d,  $J = 4.28$  Hz, 1H, ArH); 12.26 (bs, 1H,  $-\text{NH}-$ ).  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ): 22.2, 26.8, 43.6, 120.6, 122.4, 123.0, 126.9, 127.1, 128.5, 128.8, 137.7, 138.1, 139.4, 140.3, 149.6, 150.0, 150.7, 151.2, 156.3. Anal. ( $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_6$ ) C, H, N.

#### 4.2. Cytotoxicity assays on cancer cell lines

The cytotoxicity of each compound was determined using cell lines of different histological origin, as described earlier [17,36]. Briefly, cells were treated in triplicate with three different doses of each compound for 72 h. After treatments, Calcein AM solution was added, and fluorescence from live cells was measured at 485 nm/538 nm (excitation/emission) using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems). The  $\text{IC}_{50}$  value, that is, the drug concentration lethal to 50% of the tumor cells, was calculated from the dose response curves that resulted from the assays. MCF-7, K562, G361, and HCT-116 cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). All cell lines were cultivated at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ .

#### 4.3. Kinase inhibition assays

CDK2/Cyclin E kinase was produced in Sf9 insect cells via baculoviral infection and purified on a NiNTA column (Qiagen). Other CDKs were purchased from ProKinase GmbH. Kinase reactions of each test compound were assayed using a mixture of the following: 1 mg/mL histone H1 (for CDK2 and CDK5), 15  $\mu\text{M}$  and 0.15  $\mu\text{M}$  ATP for CDK2 and CDK5, respectively; 0.05  $\mu\text{Ci}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; the test compound; and reaction buffer, in a final volume of 10  $\mu\text{L}$ . The reaction buffer consisted of: 60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM  $\text{MnCl}_2$ , 3  $\mu\text{M}$  Na-orthovanadate, 1.2 mM DTT, and 2.5  $\mu\text{g}/50$   $\mu\text{L}$  PEG<sub>20,000</sub>. The reactions were stopped by adding 5  $\mu\text{L}$  of 3% aqueous  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), washed 3 times with 0.5% aqueous  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , and finally air-dried. Kinase inhibition was quantified using a FLA-7000 digital image analyzer (Fujifilm) [17,36]. The concentration of each test compound required to decrease CDK activity by 50% was determined from its dose-response curve and designated as its  $\text{IC}_{50}$ .

#### 4.4. Immunoblotting and antibodies

Immunoblotting was performed as previously described [17,36]. Briefly, 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 antibodies were purchased from: Cell Signaling (anti-FAK), Santa Cruz Biotechnology (anti-PARP, clone F-2; anti- $\beta$ -actin, clone C4; anti-Mcl-1, clone S-19), Bethyl Laboratories (anti-pRNA polymerase II antibodies phosphorylated at S5 and S2), Millipore (anti-RNA polymerase II, clone ARNA-3), Roche Applied Science (anti-5-bromo-2'-deoxyuridine-fluorescein, clone BMC 9318), Sigma-Aldrich (anti- $\alpha$ -tubulin, clone DM1A), Thermo-fisher Scientific (anti-pFAK, S732), Bioss (anti-CDK5); or were generously gifted by Dr. B. Vojtěšek (anti-p53, clone DO-1).

#### 4.5. Caspase activity assay

The cells were homogenized on ice for 20 min in an extraction buffer (10 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2% CHAPS, inhibitors of proteases, pH 7.4). The homogenates were clarified by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 30 min at 4 °C, and then the proteins were quantified and diluted to equal concentrations. Lysates were then incubated for 3 h with 100  $\mu\text{M}$  Ac-DEVD-AMC, a substrate of caspases 3 and 7, in assay buffer (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, pH 7.3). The fluorescence of the product was measured using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems) at 355/460 nm (excitation/emission).

#### 4.6. Cell cycle analysis

Sub-confluent cells were treated with different concentrations of each test compound for 24 h. The cultures were pulse-labeled with 10  $\mu\text{M}$  5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) for 30 min at 37 °C prior to harvesting. The cells were then washed in PBS, fixed with 70% ethanol, and denatured in 2 M HCl. Following neutralization, the cells were stained with anti-BrdU fluorescein-labeled antibodies, washed, stained with propidium iodide, and analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter) [17,36].

#### Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (the National Program of Sustainability I—Grant LO1204), and from the Czech Science Foundation (15-15264S and 15-17282Y).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.011>.

#### References

- [1] M. Malumbres, Cyclin-dependent kinases, *Genome Biol.* 15 (2014) 122.
- [2] U. Asghar, A.K. Witkiewicz, N.C. Turner, E.S. Knudsen, The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 130–146.
- [3] S.J. McClue, D. Blake, R. Clarke, A. Cowan, L. Cummings, P.M. Fischer, M. MacKenzie, J. Melville, K. Stewart, S. Wang, N. Zhelev, D. Zheleva, D.P. Lane, In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine), *Int. J. Cancer* 102 (2002) 463–468.
- [4] H.H. Sedlacek, Mechanisms of action of flavopiridol, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38 (2001) 139–170.
- [5] D.W. Fry, P.J. Harvey, P.R. Keller, W.L. Elliott, M. Meade, E. Trachet, M. Albassam, X. Zheng, W.R. Leopold, N.K. Pryer, P.L. Toogood, Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated anti-tumor activity in human tumor xenografts, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 1427–1438.

- [6] N. Kwiatkowski, T. Zhang, P.B. Rahl, B.J. Abraham, J. Reddy, S.B. Ficarro, A. Dastur, A. Amzallag, S. Ramaswamy, B. Tesar, C.E. Jenkins, N.M. Hannett, D. McMillin, T. Sanda, T. Sim, N.D. Kim, T. Look, C.S. Mitsiades, A.P. Weng, J.R. Brown, C.H. Benes, J.A. Marto, R.A. Young, N.S. Gray, Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor, *Nature* 511 (2014) 616–620.
- [7] T.K. Albert, C. Rigault, J. Eickhoff, K. Baumgart, C. Antrecht, B. Klebl, G. Mittler, M. Meisterernst, Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 55–68.
- [8] S. Dhillon, Palbociclib: first global approval, *Drugs* 75 (2015) 543–551.
- [9] A. DeMichele, A.S. Clark, K.S. Tan, D.F. Heitjan, K. Gramlich, M. Gallagher, P. Lal, M. Feldman, P. Zhang, C. Colameco, D. Lewis, M. Langer, N. Goodman, S. Domchek, K. Gogineni, M. Rosen, K. Fox, P. O'Dwyer, CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 995–1001.
- [10] R.S. Finn, J.P. Crown, I. Lang, K. Boer, I.M. Bondarenko, S.O. Kulyk, J. Ettl, R. Patel, T. Pinter, M. Schmidt, Y. Shparyk, A.R. Thummala, N.L. Voytko, C. Fowst, X. Huang, S.T. Kim, S. Randolph, D.J. Slamon, The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study, *Lancet Oncol.* 16 (2015) 25–35.
- [11] R. Jorda, K. Paruch, V. Krystof, Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2974–2980.
- [12] 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.
- [13] E. Reznickova, S. Weitensteiner, L. Havlicek, R. Jorda, T. Gucky, K. Berka, V. Bazgier, S. Zahler, V. Krystof, M. Strnad, Characterization of a pyrazolo[4,3-d]pyrimidine inhibitor of cyclin-dependent kinases 2 and 5 and aurora A with pro-apoptotic and anti-angiogenic activity in vitro, *Chem. Biol. Drug Des.* 85 (2015) 1528–1540.
- [14] I.M. Sroka, E.H. Heiss, L. Havlicek, F. Totzke, Y. Aristei, P. Pechan, M.H. Kubbutat, M. Strnad, V.M. Dirsch, A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells, *Mol. Pharmacol.* 77 (2010) 255–261.
- [15] S.B. Weitensteiner, J. Liebl, V. Krystof, L. Havlicek, T. Gucky, M. Strnad, R. Furst, A.M. Vollmar, S. Zahler, Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors, *PLoS One* 8 (2013) e54607.
- [16] K. Bettayeb, N. Oumata, A. Echalié, Y. Ferandin, J.A. Endicott, H. Galons, L. Meijer, CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases, *Oncogene* 27 (2008) 5797–5807.
- [17] T. Gucky, R. Jorda, M. Zatloukal, V. Bazgier, K. Berka, E. Reznickova, T. Beres, M. Strnad, V. Krystof, A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 6234–6247.
- [18] M.P. Trova, K.D. Barnes, L. Alicea, T. Benanti, M. Bielaska, J. Bilotta, B. Bliss, T.N. Duong, S. Haydar, R.J. Herr, Y. Hui, M. Johnson, J.M. Lehman, D. Peace, M. Rainka, P. Snider, S. Salamone, S. Tregay, X. Zheng, T.D. Friedrich, Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6613–6617.
- [19] M.P. Trova, K.D. Barnes, C. Barford, T. Benanti, M. Bielaska, L. Burry, J.M. Lehman, C. Murphy, H. O'Grady, D. Peace, S. Salamone, J. Smith, P. Snider, J. Toporowski, S. Tregay, A. Wilson, M. Wyle, X. Zheng, T.D. Friedrich, Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6608–6612.
- [20] D. Parry, T. Guzi, F. Shanahan, N. Davis, D. Prabhavalkar, D. Wiswell, W. Seghezzi, K. Paruch, M.P. Dwyer, R. Doll, A. Nomeir, W. Windsor, T. Fischmann, Y. Wang, M. Oft, T. Chen, P. Kirschmeier, E.M. Lees, Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 2344–2353.
- [21] D. Moravcova, L. Havlicek, V. Krystof, R. Lenobel, M. Strnad, Novel pyrazolo [4,3-d]pyrimidines, processes for their preparation and method for therapy, WO 2003/082872, 2003.
- [22] K. Bettayeb, H. Sallam, Y. Ferandin, F. Popowycz, G. Fournet, M. Hassan, A. Echalié, P. Bernard, J. Endicott, B. Joseph, L. Meijer, N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2713–2724.
- [23] Y.T. Chang, N.S. Gray, G.R. Rosania, D.P. Sutherlin, S. Kwon, T.C. Norman, R. Sarohia, M. Leost, L. Meijer, P.G. Schultz, Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors, *Chem. Biol.* 6 (1999) 361–375.
- [24] L. Havlicek, J. Hanus, J. Vesely, 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.
- [25] N. Oumata, K. Bettayeb, Y. Ferandin, L. Demange, A. Lopez-Giral, M.L. Goddard, V. Myrianthopoulos, E. Mikros, M. Flajolet, P. Greengard, L. Meijer, H. Galons, Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 5229–5242.
- [26] B.A. Carlson, M.M. Dubay, E.A. Sausville, L. Brizuela, P.J. Worland, Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells, *Cancer Res.* 56 (1996) 2973–2978.
- [27] R. Chen, W.G. Wierda, S. Chubb, R.E. Hawtin, J.A. Fox, M.J. Keating, V. Gandhi, W. Plunkett, Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 113 (2009) 4637–4645.
- [28] S.R. Whittaker, M.I. Walton, M.D. Garrett, P. Workman, The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway, *Cancer Res.* 64 (2004) 262–272.
- [29] M. Daval, T. Gurlo, S. Costes, C.J. Huang, P.C. Butler, Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic beta-cell survival via Fak-Akt signaling pathways, *Diabetes* 60 (2011) 1186–1197.
- [30] Q. Liang, L. Li, J. Zhang, Y. Lei, L. Wang, D.X. Liu, J. Feng, P. Hou, R. Yao, Y. Zhang, B. Huang, J. Lu, CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2932.
- [31] O. Tetsu, F. McCormick, Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition, *Cancer Cell.* 3 (2003) 233–245.
- [32] J. Du, H.R. Widlund, M.A. Horstmann, S. Ramaswamy, K. Ross, W.E. Huber, E.K. Nishimura, T.R. Golub, D.E. Fisher, Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF, *Cancer Cell.* 6 (2004) 565–576.
- [33] C. Abdullah, X. Wang, D. Becker, Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma, *Cell Cycle* 10 (2011) 977–988.
- [34] B.M. Desai, J. Villanueva, T.T. Nguyen, M. Lioni, M. Xiao, J. Kong, C. Krepler, A. Vultur, K.T. Flaherty, K.L. Nathanson, K.S. Smalley, M. Herlyn, The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling, *PLoS One* 8 (2013) e59588.
- [35] S. Mohapatra, D. Coppola, A.L. Riker, W.J. Pledger, Roscovitine inhibits differentiation and invasion in a three-dimensional skin reconstruction model of metastatic melanoma, *Mol. Cancer Res.* 5 (2007) 145–151.
- [36] C.B. Baltus, R. Jorda, C. Marot, K. Berka, V. Bazgier, V. Krystof, G. Prié, M.C. Viaud-Massuard, Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of a novel series of 7-azaindole based tri-heterocyclic compounds as potent CDK2/Cyclin E inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 108 (2016) 701–719.

# Příloha 3

**Vymětalová L**, Kryštof V, Havlíček L, Lord J, Strnad M. Proapoptotic Activity of Trisubstituted Purines and Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines in Neutrophils. *J Med Chem* (v přípravě).

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.

**Proapoptotic Activity of Trisubstituted Purines and  
Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines in Neutrophils**

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Brief Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Vymetalova, Ladislava; Faculty of Science, Palacky University and Institute of Experimental Botany ASCR,, Laboratory of Growth Regulators, Krystof, Vladimir; Palacky University, Laboratory of Growth Regulators Havlicek, Libor; Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i., Isotope laboratory Lord, Janet; University of Birmingham, MRC-ARUK Centre for Musculoskeletal Ageing Research Strnad, Miroslav; Faculty of Science, Palacky University and Institute of Experimental Botany ASCR,, Laboratory of Growth Regulators,

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4 **Proapoptotic Activity of Trisubstituted Purines and Pyrazolo[4,3-**  
5 **d]pyrimidines in Neutrophils**  
6  
7  
8

9 Vymětalová Ladislava,<sup>1</sup> Kryštof Vladimír,<sup>1</sup> Havlíček Libor,<sup>2</sup> Lord Janet,<sup>3</sup> Strnad Miroslav<sup>1</sup>  
10  
11  
12

13  
14 <sup>1</sup> *Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of*  
15 *Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic*  
16

17 <sup>2</sup> *Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany AS CR, v.v.i., Videňská 1083, 14220*  
18 *Prague 4, Czech Republic*  
19

20 <sup>3</sup> *MRC-ARUK Centre for Musculoskeletal Ageing Research, School of Immunity and Infection,*  
21 *University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK*  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31 **Corresponding Author Information.** Vladimír Kryštof, Laboratory of Growth Regulators, Palacký  
32 University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic.  
33 Phone: +420585634854, Fax: +420585634870.  
34 E-mail: vladimir.krystof@upol.cz  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 **Keywords**

47 Cyclin-dependent kinase, inhibitor, selectivity, neutrophil, apoptosis, inflammation  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

Neutrophils also known as polymorphonuclear leukocytes present the most abundant cell type playing a key role in the innate immune responses. A deregulation of neutrophil half-life or functions leads often to a rise of different chronic inflammatory and autoimmune diseases whose treatment is still complicated due to many side effects of used drugs. However, the recent studies show that cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors induce neutrophil apoptosis by a downregulation of antiapoptotic protein Mcl-1 which normally neutralizes Bcl-2 family members (Bid, Bax, Bak). In the absence of Mcl-1 these proteins form pores in the outer mitochondrial membrane leading to a release of cytochrome *c*, a formation of apoptosome and an activation of caspases. Mcl-1 as a member of Bcl-2 family has an extremely short half-life thanks to PEST sequences in its C-terminal end whereas this site is a target for diverse posttranslational modifications such as phosphorylations or ubiquitinations regulating protein stability. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by CDK inhibitors presents elegant way for downregulation of Mcl-1. We tested our chemical library of forty two compounds (trisubstituted purines and pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines) on the ability to induce apoptosis in neutrophils. Two most potent pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines showed were studied in detail. Both compounds induced morphological changes typical for apoptosis, downregulated RNA polymerase II and Mcl-1 and overrode neutrophil oxygen radical production.

## Introduction

Neutrophils (also known as polymorphonuclear leukocytes or PMNs) present the most abundant cell type playing a key role in the innate immune responses. They are drawn from the circulation to sites of inflammation by a variety of factors like IL-8, LTB<sub>4</sub> or fMLP (Loike et al 1995) where are then able to kill microorganisms by phagocytosis or secretion of their toxic content into the extracellular space. Under the pressure of these signals and other endogenous cytokines (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-6) a half-life of neutrophils can be extended from 7-12 h up to 10-fold (Fox et al 2010) leading to an overactivation followed by necrosis and a release of granules resulting in tissue damage and thus to a rise of different chronic inflammatory or autoimmune diseases (Németh & Mócsai 2012).

The best solution for a treatment of these diseases is an induction of neutrophil apoptosis and their consecutive removal by other specialized phagocytes such as macrophages in the process called efferocytosis (Savill et al 1989). Indeed, Ren et al have approved the protective effect of apoptotic cells against LPS-induced endotoxic shock in mice. Current therapy is based on an administration of glucocorticosteroid drugs, which are very successful in the treatment of eosinophil-driven inflammatory diseases like asthma (Lamas et al 1991) but surprisingly prolong neutrophil survival (Meagher et al 1996). Usage of non-steroidal compounds inhibiting cyclo-oxygenase 1 and 2 (COX-1, 2) has been linked with some side effects as a development of peptic ulcer disease or heart attack (Fosbøl EL et al 2009). Another example of anti-inflammatory drugs includes lipid-derived chemicals such as aspirin-triggered 15-epi-LXA (El Kebir et al 2009), anti-TNF- $\alpha$  compounds (Williams et al 2007) or newly CDK inhibitors.

Neutrophil survival is tightly regulated process highly dependent on an expression of antiapoptotic protein Mcl-1 (Leuenroth et al 2000). Mcl-1 is a member of Bcl-2 family which has thanks to PEST sequences in its C-terminal end extremely short half-life about 3 h (Moulding et al 2001). Namely, this part of Mcl-1 is a target for diverse posttranslational modifications such as phosphorylations or ubiquitinations directing its stability (Edwards et al 2004). A function of Mcl-1 in neutrophil survival lies in neutralization of other Bcl-2 family members (Bid, Bax, Bak) which in the absence of Mcl-1 form pores in the outer mitochondrial membrane leading to release of cytochrome *c*, formation of apoptosome and activation of caspases. An inhibition of transcription based on blocking of RNA polymerase II phosphorylation presents elegant way for downregulation of Mcl-1 that was also demonstrated by usage of roscovitine, CDK2, 5, 7 and 9 inhibitor, which markedly enhanced resolution of carrageenan-elicited acute pleurisy, bleomycin-induced lung injury and passively induced arthritis in mice (Rossi et al 2006). Roscovitine was also able to override powerful antiapoptotic signals from survival factors such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Rossi et al 2006).

## Material and methods

### Studied compounds

2,6,9-Trisubstituted purines and 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines were synthesized and characterized according to previously described methods (Zatloukal et al 2013, Gucky et al 2013, Vymetalova et al 2016). The compounds were dissolved in DMSO at a concentration 100 mM and diluted with culture media prior assays. The maximum DMSO concentration in assays never exceeded 0.1%.

### Isolation and culture of human neutrophils

The neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy human donors as described previously (Afford et al 1992). Briefly, blood was collected into tubes containing EDTA followed by usage of 2% dextran solution for sedimentation of erythrocytes. The neutrophils were then isolated from leukocyte layer using a discontinuous Percoll density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich, Poole, UK) and resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sera Laboratories International, Bolney, UK), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). The purity of isolated neutrophils was assessed by Giemsa staining (Diff-Quick, Baxter Healthcare, UK) and light microscopy and was routinely greater than 97 %. The neutrophils were then cultured in the presence of studied compounds and other stimulating factors.

### Assessment of nuclear morphology

After competent treatment, neutrophils were spun onto slides at 300 g for 5 min, the preparations were then differentially stained using a commercial May-Grunwald Giemsa stain and assessed for apoptotic morphology by light microscopy by means of Olympus IX71 microscope (Olympus America Inc., Center Valley, PA).

### Measurement of neutrophil apoptosis

For evaluation of early apoptosis, neutrophils were double stained with anti-Annexin V FITC-conjugated antibody (BD Pharmingen) binding extracellular phosphatidylserine and propidium iodide (Sigma-Aldrich) detecting late apoptotic and necrotic cells. After appropriate treatment, cells were once washed with PBS, centrifuged at 250 g for 5 min at 4°C and then resuspended in 100 µl of Annexin V buffer (10 mM HEPES, pH 7.4; 140 mM NaCl; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). 1 µl of anti-Annexin V FITC-conjugated antibody was added per well and cells were then incubated at room temperature for 10 minutes followed by addition of propidium iodide at final concentration of 5 µg/ml. Neutrophils were consequently transferred



1  
2  
3 into FACS tubes and fluorescence was analyzed by means of flow cytometry (BD Accuri C6 Flow  
4 Cytometer, Accuri Cytometers Inc.) with Annexin V positive / PI negative cells taken as apoptotic.  
5  
6

### 7 8 **Superoxide generation assay**

9  
10 Levels of reactive oxygen species (ROS) generated by neutrophils were measured using a luminol-based  
11 chemiluminescent assay (Gyllenhammar 1987). After treatment, neutrophils were resuspended in Hank's  
12 Balanced Salt Solution (HBSS) containing calcium and magnesium (Gibco) and transferred to opaque 96  
13 well plates (Greiner Bio-One GmbH). Luminol was then added to each well at final concentration of 100  
14  $\mu\text{M}$  followed by a measuring of chemiluminescence in response to the stimulus fMLP (2.5  $\mu\text{M}$ ) at 1 min  
15 intervals for 30 min by means of a luminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies, Bad Wildbad,  
16 Germany).  
17  
18  
19  
20

### 21 22 **Western blot analysis**

23  
24 Neutrophils were after treatment resuspended in SDS-PAGE sample buffer (125 mM HCl, pH 6.8; 5%  
25 glycerol; 2% SDS; 1%  $\beta$ -mercaptoethanol; 0.003% bromophenol blue), prepared lysates were incubated  
26 for 10 min at 100 °C, then separated by means of SDS-PAGE and blotted onto PVDF membranes. Non-  
27 specific protein binding was blocked using 5% BSA. The membranes were consequently incubated with  
28 primary antibodies against phospho-S2 and S5 RNA polymerase II (Bethyl Laboratories, 1:1000), Mcl-1,  
29 Bak and  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology, 1:500, 1:500 resp. 1:1000) overnight at 4°C followed by  
30 incubation with appropriate secondary antibodies (ECLTM anti-rabbit or anti-mouse IgG; GE Healthcare,  
31 Sweden) for 1 hour at room temperature. The proteins were visualized by ECL according to  
32 manufacturer's instructions (GeneFlow, UK). Densitometric analyses were performed using Multi Gauge  
33 software (FujiFilm).  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

## 44 **Results**

### 45 46 **CDK inhibitors induce apoptosis in human neutrophils**

47  
48  
49 Based on the observation of potent proapoptotic activity of roscovitine in human neutrophils described  
50 recently (Rossi et al 2006), we have selected 44 potent CDK inhibitors, including 2,6,9-trisubstituted  
51 purines and 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines, prepared in our laboratory, and assayed them  
52 with human neutrophils to determine their ability to induce apoptosis. Isolated human neutrophils were  
53 incubated with studied compounds at a single dose of 0.01  $\mu\text{M}$  for 8 h, stained with Annexin V and then  
54 analysed by flow cytometry. Although all studied compounds were potent CDK inhibitors (as described  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 earlier), only 21 compounds increased apoptosis in neutrophils above the basal level of 50 % (Figure 1).  
4 Interestingly, some compounds had positive effect on neutrophil survival. The most potent were  
5 LGR2674, LGR2893, LGR3437, LGR3465 and LGR3491, triggering apoptosis in approximately 90 % of  
6 neutrophils.  
7  
8  
9

### 10 11 12 13 **LGR3437 and LGR3465 induce human neutrophils apoptosis**

14  
15  
16 For detailed study on mechanism of action, we selected LGR3437 and LGR3465 which were then tested  
17 for concentration-dependent effects on the induction of apoptosis in neutrophils. After 8 h treatment  
18 LGR3437 started to enhance apoptosis from 10 nM with consequent growth almost to 90 % at 100 nM as  
19 well as 1  $\mu$ M (**Fig. 2A**). LGR3465 was more efficient because it increased apoptosis already at 0.1 nM  
20 (**Fig. 2A**).  $IC_{50}$  values for both compounds were calculated from the curves at  $11.6 \pm 1.3$  and  $4.8 \pm 2.5$  nM  
21 for LGR3437 and LGR3465, respectively. For confirmation of proapoptotic action of these chemicals we  
22 provided morphological analysis of neutrophil nuclei using Giemsa staining. During cell death nucleus  
23 loses its typical lobular shape and chromatin condenses forming ring structure. After treatment by 10 nM  
24 of both compounds most of the cells appeared to be apoptotic (**Fig. 2B**).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 **LGR3437 and LGR3465 target RNA polymerase II transcriptional machinery**

34  
35 R-roscovitine as a potent inhibitor of CDK7 and CDK9 blocks RNA polymerase II activity leading to  
36 Mcl-1 decrease, a disruption of mitochondrial membrane integrity and an activation of apoptosis (Leitch  
37 2012). Our compounds are derivatives of roscovitine and should thus exhibit similar effect. For  
38 confirmation we provided expression analysis of some proteins involved in regulation of apoptosis. After  
39 8 h treatment of neutrophils by both chemicals phosphorylation of RNA polymerase II on S2 and S5  
40 gradually declined (**Fig. 3A**). A level of Mcl-1 lighter form was analyzed densitometrically and obtained  
41 data are shown in **Fig. 3B**. LGR3437 induced sequential decrease from 60 % at 0.01  $\mu$ M, more than 22 %  
42 at 0.1  $\mu$ M and final fall to 14 % at 1  $\mu$ M. LGR3465 was even more efficient with 31 % at 0.01  $\mu$ M and  
43 following decline to 21 % at 1  $\mu$ M (**Fig. 3B**). We surprisingly detected another band with higher mass  
44 which we predicted as possible posttranslational modification of Mcl-1. A level of this form was  
45 increasing in concentration-dependent manner of both compounds and reached the maximum at 1  $\mu$ M  
46 LGR3465 (**Fig. 3B**). A proapoptotic protein Bak showed also concentration-dependent growth which was  
47 more striking in the case of LGR3465 (**Fig. 3B**). We thus demonstrated that our compounds effectively  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 inhibit function of RNA polymerase II which leads to disruption of equilibrium maintaining integrity of  
4 mitochondrial membrane.  
5  
6  
7  
8  
9

### 10 **LGR3437 and LGR3465 override prosurvival effect of GM-CSF**

11 Although LGR3437 and LGR3465 induced efficiently neutrophil apoptosis, their potential use as anti-  
12 inflammatory drugs depends on ability to reverse the effects of agents extending neutrophil life-span. For  
13 following experiment we chose cytokine GM-CSF which levels are elevated in many autoimmune and  
14 inflammatory diseases. In our assay GM-CSF delayed apoptosis of neutrophils about 20 % compared to  
15 control (**Fig. 4A**). After 2 h there was no difference between control and treated cells, whereas average  
16 rate of apoptosis got around 13 % (**Fig. 4A**). However, apoptotic neutrophils rose up to 45 % after 6 h  
17 treatment by both compounds with striking increase almost to 80 % after 20 h (**Fig. 4A**). The percentages  
18 of apoptotic cells after treatment by both compounds were in average about 30 % higher than in GM-CSF  
19 stimulating neutrophils (**Fig. 4A**) confirming the ability of new chemicals to suppress effects of this  
20 antiapoptotic cytokine.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 Then we provided the same experiment and analysed an expression of Mcl-1 using western  
29 blotting. In control cells, a level of protein was gradually decreasing after 6 h with the biggest decline after  
30 20 h. This phenomenon was completely abolished by GM-CSF which maintained stable protein level of  
31 Mcl-1 during whole time-dependent assay. LGR3437 and LGR3465 efficiently inhibited Mcl-1 expression  
32 already after 6 h followed by complete suppression of lighter form after 8 h. This decrease was linked with  
33 simultaneous rise of Mcl-1 heavier form. We thus showed by this experiment that the effect of our  
34 compounds on Mcl-1 protein reduction is very fast.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **LGR3437 and LGR3465 suppress production of reactive oxygen species**

44 For successful treatment of inflammatory diseases it is necessary to inhibit neutrophil functions. Therefore  
45 we investigated an ability of GM-CSF stimulated neutrophils to produce oxygen radicals in response to  
46 2.5  $\mu$ M fMLP after 1 h treatment by both compounds. Inhibition of oxygen radical production was evident  
47 on the main peak invoked by fMLP action. Both LGR3437 and LGR3465 suppressed generation of  
48 reactive oxygen species in a dose-dependent manner (**Fig. 5**).  $IC_{50}$  values were calculated from the main  
49 peak values at 2.5  $\mu$ M and 5.5  $\mu$ M for LGR3437 and LGR3465, respectively.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Discussion

CDKs are essential signaling proteins that were first identified as regulators of cell cycle controlling entirely the fate of proliferating cells. A deregulation of their activity mediated by diverse mechanisms often leads to cell turnover and tumor development. Therefore, CDKs have recently become an attractive target for new anticancer therapies. During last two decades, many of small molecule inhibitors have been developed through various approaches and more than 20 are now in different phases of clinical trials (Krystof and Uldrijan 2010).

Neutrophils as terminally differentiated cells that are not dividing were thought not to express functional CDKs and thus not to be sensitive to CDK inhibitors. Indeed, Klausen et al. (2004) described progressive loss of CDK2, 4, 6 during granulopoiesis of primary healthy human bone-marrow cells, which began at the myelocyte/metamyelocyte stage and was almost complete by full maturation. This was consistent with an upregulation of the endogenous CDK inhibitor p27kip1 which levels started to increase from myelocyte/metamyelocyte stage and reached the peak in PMNs. However, CDK1 and CDK2 were detected at the constant levels in freshly isolated and aged neutrophils as well as neutrophils treated with GM-CSF, roscovitine or gliotoxin (Rossi 2006). CDK5 was earlier known as a regulator of neuronal processes such as cytoskeletal dynamics or synaptic function, although many non-neuronal functions are now emerging. CDK5-p35 complex was detected in secretory granules of neutrophils with increased activity upon GTP stimulation (Rosales 2004). Roscovitine completely blocked GTP-stimulated granule CDK5 activity that led to decreased lactoferrin secretion as well as CDK63 and CD66b surface localization (Rosales 2004). Other members of CDK family, CDK7 and CDK9, are also highly expressed in neutrophils (Wang 2012). The application of CDK inhibitors with varying selectivity towards different CDKs suggested an importance of CDK9 activity in regulation of neutrophil lifespan (Wang 2012). Moreover CDK9 activity and the expression of its activating partner cyclin T1 decreased during neutrophil aging followed by entry to spontaneous apoptosis (Wang 2012). These findings provided new insights into issue of inflammatory diseases and gave the base to novel therapeutic strategies.

Recent studies have shown that CDK inhibitors, mainly known as efficient anticancer drugs, could be active also against inflammatory diseases induced by abnormal functions of neutrophils (Rossi 2006, Leitch 2010, Leitch 2012, Wang 2012). Although roscovitine inhibited apoptosis of terminally differentiated neurons (Maas 1998), its effect on neutrophil viability was opposite. Roscovitine induced caspase-dependent apoptosis of neutrophils in a time- and concentration-dependent manner even in the presence of different powerful pro-survival agents such as dbcAMP, GM-CSF or LPS (Rossi 2006). Surprisingly, roscovitine targeted only inflammatory neutrophils providing important advantage for future therapies (Rossi 2006). Neutrophils are also capable of phenotypic alteration during early stages of resolution of inflammation, switching from a phenotype that generates pro-inflammatory mediators to one

1  
2  
3 generating anti-inflammatory and/or pro-resolving mediators (Rossi 2006). Roscovitine treatment  
4 promoted apoptosis by reducing concentrations of the anti-apoptotic protein Mcl-1 (Rossi 2006). Leitch et  
5 al. (2010) showed that downregulation of Mcl-1 by roscovitine occurred at the mRNA level already after 2  
6 h and was more pronounced at 4 h. Although caspase inhibitor prevented neutrophil apoptosis, Mcl-1  
7 protein level was almost unaffected suggesting Mcl-1 downregulation occurs upstream of caspase  
8 activation (Leitch 2012).  
9  
10

11  
12  
13 In this study we foreshadowed possible mechanism of Mcl-1 degradation involving  
14 phosphorylation of T163/S159 in its PEST sequence. Although Mcl-1 phosphorylation on T163 by  
15 extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) leads to stabilization of Mcl-1 protein  
16 level and increased viability (Zhao 2009, Liao 2011, Ding 2008, Wang 1999, Booy 2011), it  
17 simultaneously serves as a priming site for glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ )-induced  
18 phosphorylation at S159 (Morel 2009, Mauer 2006). This modification is then recognized by Mule,  $\beta$ -  
19 TrCP or Fbw7 E3 ubiquitin ligases which earmark Mcl-1 for destruction in proteasome (Zhong 2005,  
20 Ding 2007, Inuzuka 2011).  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

### 29 **Acknowledgements**

30  
31 The authors gratefully acknowledge support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the  
32 Czech Republic (the National Program of Sustainability I – Grant LO1204), and from the Czech Science  
33 Foundation (15-15264S).  
34  
35  
36  
37  
38

### 39 **References**

- 40  
41  
42 Afford SC et al (1992) The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line  
43 U937 and human neutrophils. *J Biol Chem* 267(30):21612-6.  
44  
45  
46 Edwards SW et al (2004) Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem Soc Trans* 32(Pt3):489-  
47 92.  
48  
49  
50 El Kebir D et al (2009) 15-epi-lipoxin A4 inhibits myeloperoxidase signaling and enhances resolution of  
51 acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 180(4):311-9.  
52  
53  
54 Fosbøl EL et al (2009) Risk of myocardial infarction and death associated with the use of nonsteroidal  
55 anti-inflammatory drugs (NSAIDs) among healthy individuals: a nationwide cohort study. *Clin*  
56 *Pharmacol Ther* 85(2):190-7.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 Fox S et al (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory  
4 disease. *J Innate Immun* 2(3):216-27.  
5  
6  
7 Gucký T et al (2013) A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase  
8 inhibitors. *J Med Chem* 56(15):6234-47.  
9  
10  
11 Gyllenhammar H (1987) Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide  
12 production. *J Immunol Methods* 97(2):209-13.  
13  
14  
15 Lamas AM et al (1991) Glucocorticoids inhibit eosinophil responses to granulocyte-macrophage colony-  
16 stimulating factor. *J Immunol* 147(1):254-9.  
17  
18  
19 Leuenroth SJ et al (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes  
20 apoptosis. *J Leukoc Biol* 68(1):158-66.  
21  
22  
23  
24 Loike JD et al (1995) Fibrin regulates neutrophil migration in response to interleukin 8, leukotriene B4,  
25 tumor necrosis factor, and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Exp Med* 181(5):1763-72.  
26  
27  
28 Meagher LC et al (1996) Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and  
29 eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 156(11):4422-8.  
30  
31  
32 Moulding DA et al (2001) BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated  
33 apoptosis. *J Leukoc Biol* 70(5):783-92.  
34  
35  
36 Németh T, Mócsai A (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 143(1):9-19.  
37  
38  
39 Ren Y et al (2008) Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol*  
40 180(7):4978-85.  
41  
42  
43 Rossi AG et al (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by  
44 promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med* 12(9):1056-64.  
45  
46  
47 Savill JS et al (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell  
48 death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83(3):865-75.  
49  
50  
51 Vymětalová L et al (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-  
52 d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent  
53 kinases. *Eur J Med Chem* 110:291-301  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Williams RO et al (2007) Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Curr Opin Pharmacol* 7(4):412-7.

Zatloukal M 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.

**Figure legends**

**Fig. 1** Antiapoptotic activity of prepared compounds in neutrophils. Isolated human neutrophils were incubated with the single doses of compounds (0.01  $\mu$ M) for 8 h, stained with Annexin V and then analysed by flow cytometry.

**Fig. 2** LGR3437 and LGR3465 induce neutrophil apoptosis. **(A)** Isolated human neutrophils were incubated with both compounds for 8 h at the indicated concentrations followed by flow cytometric analysis of Annexin V binding. Data are mean  $\pm$  s.d. for three separate experiments. **(B)** Morphological changes of nuclei after 8 h treatment with both compounds at 10 nM were assessed by means of cytocentrifuge preparations and Giemsa staining. Here are shown representative images of at least three experiments.

**Fig. 3** LGR3437 and LGR3465 inhibit RNA polymerase II phosphorylation on serine 2 and 5 leading to protein changes of apoptotic regulators. **(A)** Freshly isolated human neutrophils were incubated with indicated concentrations of both compounds for 8 h followed by western blot analysis of highlighted proteins. Here are shown representative images from two experiments. **(B)** A quantification of Mcl-1 lighter form was analyzed densitometrically using Multi Gauge software and normalized on  $\beta$ -actin levels.

**Fig. 4** LGR3437 and LGR3465 overcome an antiapoptotic effect of GM-CSF. **(A)** Isolated human neutrophils were cultured in the presence of prosurvival factor GM-CSF (10 ng/ml) with or without both compounds (1  $\mu$ M) for different time periods followed by flow cytometric analysis of Annexin V binding. Data are mean  $\pm$  s.d. for four separate experiments. **(B)** An expression of Mcl-1 in neutrophils treated the same way as in the case A was analyzed using western blotting. Representative images are shown.

**Fig. 5** LGR3437 and LGR3465 override neutrophil oxygen radical production. Isolated human neutrophils were incubated in the presence of prosurvival factor GM-CSF (10 ng/ml) with or without both compounds at indicated concentrations for 1 h. A production of ROS during stimulation with fMLP (2.5  $\mu$ M) was measured using a luminol-based chemiluminiscent assay. Here are shown representative images from at least three separate experiments.



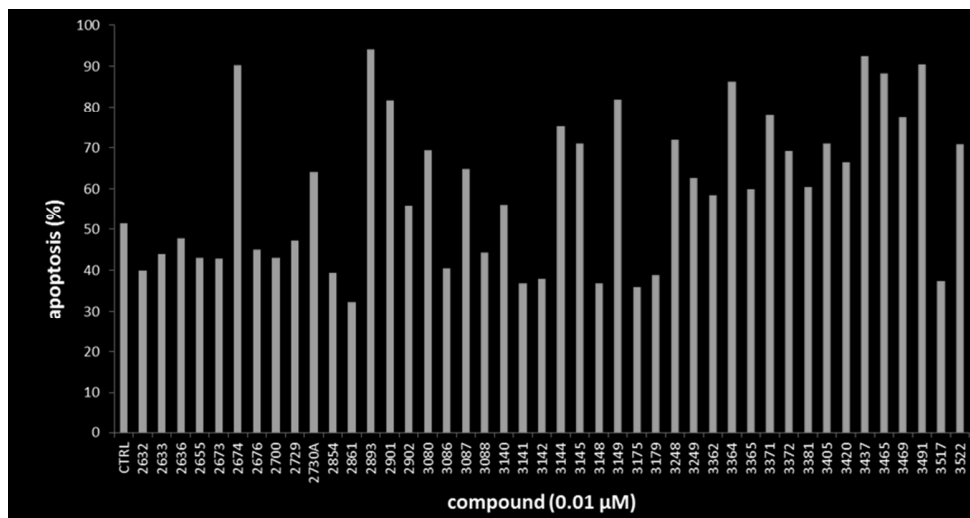


Fig. 1 Antiapoptotic activity of prepared compounds in neutrophils. Isolated human neutrophils were incubated with the single doses of compounds (0.01  $\mu\text{M}$ ) for 8 h, stained with Annexin V and then analysed by flow cytometry.

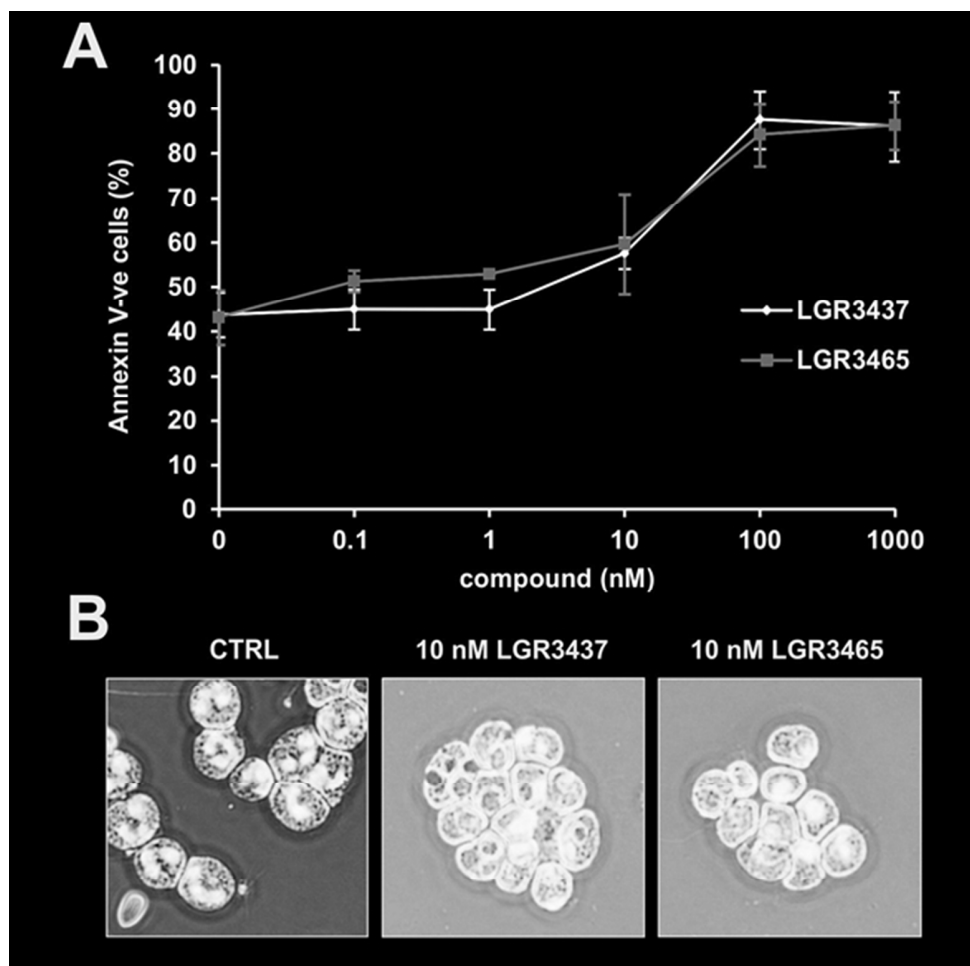


Fig. 2 LGR3437 and LGR3465 induce neutrophil apoptosis. (A) Isolated human neutrophils were incubated with both compounds for 8 h at the indicated concentrations followed by flow cytometric analysis of Annexin V binding. Data are mean  $\pm$  s.d. for three separate experiments. (B) Morphological changes of nuclei after 8 h treatment with both compounds at 10 nM were assessed by means of cyto centrifuge preparations and Giemsa staining. Here are shown representative images of at least three experiments.

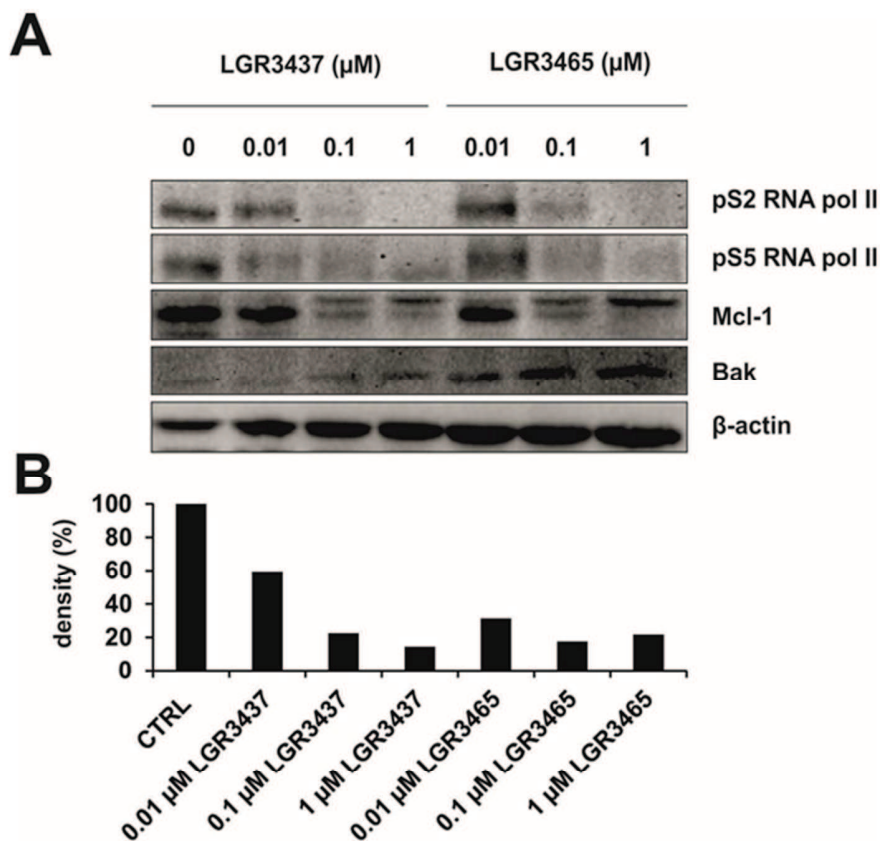


Fig. 3 LGR3437 and LGR3465 inhibit RNA polymerase II phosphorylation on serine 2 and 5 leading to protein changes of apoptotic regulators. (A) Freshly isolated human neutrophils were incubated with indicated concentrations of both compounds for 8 h followed by western blot analysis of highlighted proteins. Here are shown representative images from too experiments. (B) A quantification of Mcl-1 lighter form was analyzed densitometrically using Multi Gauge software and normalized on  $\beta$ -actin levels.

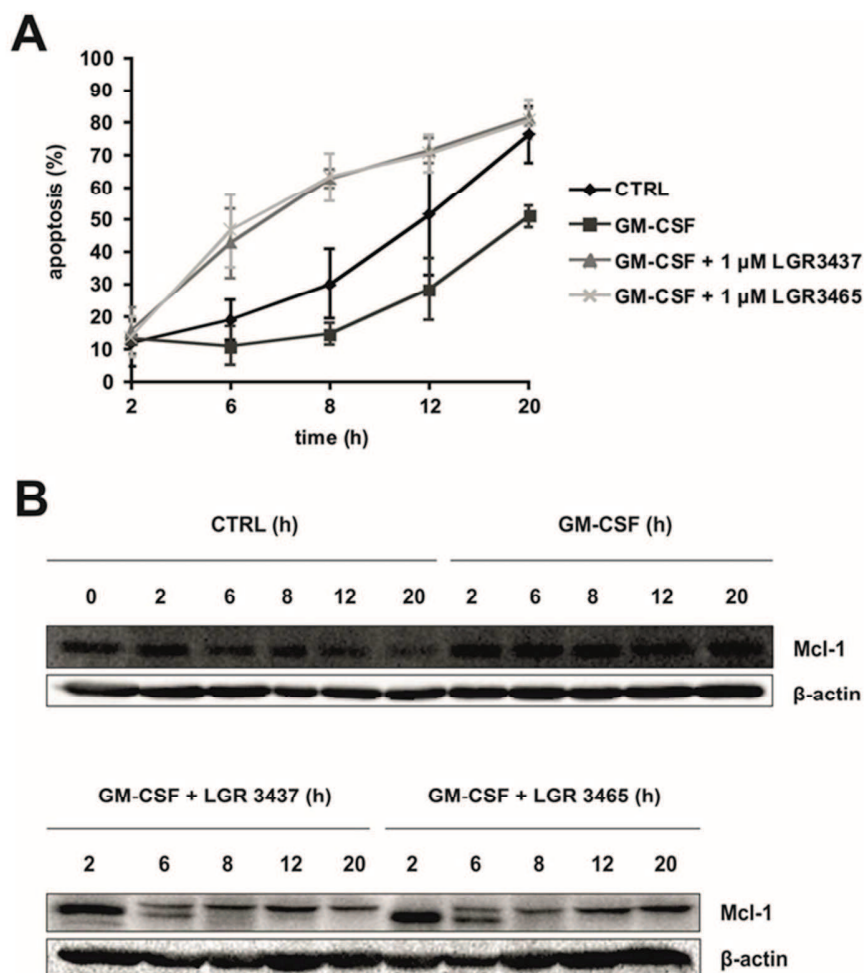


Fig. 4 LGR3437 and LGR3465 overcome an antiapoptotic effect of GM-CSF. (A) Isolated human neutrophils were cultured in the presence of prosurvival factor GM-CSF (10 ng/ml) with or without both compounds (1  $\mu$ M) for different time periods followed by flow cytometric analysis of Annexin V binding. Data are mean  $\pm$  s.d. for four separate experiments. (B) An expression of Mcl-1 in neutrophils treated the same way as in the case A was analyzed using western blotting. Representative images are shown.

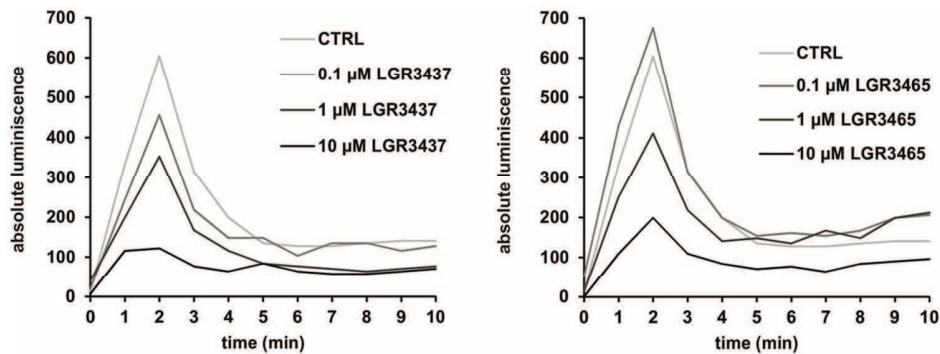
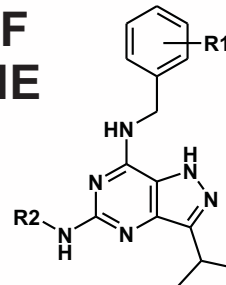


Fig. 5 LGR3437 and LGR3465 override neutrophil oxygen radical production. Isolated human neutrophils were incubated in the presence of prosurvival factor GM-CSF (10 ng/ml) with or without both compounds at indicated concentrations for 1 h. A production of ROS during stimulation with fMLP (2.5 μM) was measured using a luminol-based chemiluminiscent assay. Here are shown representative images from at least three separate experiments.

# Příloha 4

**Vymětalová L**, Havlíček L, Jorda R, Kryštof V, Strnad M: Novel pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Molecular Insights for Innovative Therapies*, Dec 1-3, 2011, Heidelberg, Germany.

# NOVEL PYRAZOLO[4,3-d]PYRIMIDINE DERIVATIVES OF CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR ROSCOVITINE



Ladislava Vymětalová, Libor Havlíček, Radek Jorda, Vladimír Kryštof and Miroslav Strnad

Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science and Institute of Experimental Botany ASCR, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

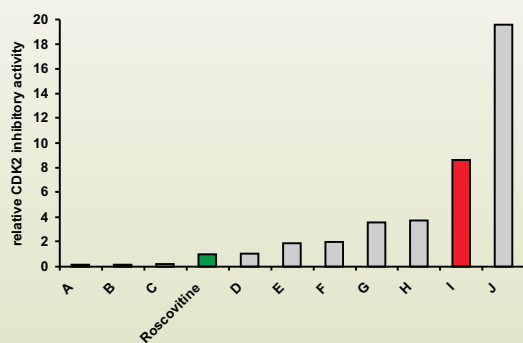
✉ ladislava.vymetalova@upol.cz

## INHIBITION OF CYCLIN-DEPENDENT KINASE 2

A discovery of roscovitine as an efficient pan-selective CDK inhibitor inspired us to synthesize its new derivatives with pyrazolo[4,3-d]pyrimidine core. Due to the strong CDK2 inhibitory activity of roscovitine, we also evaluated the preference of its new derivatives for this kinase. As seen in **Table I.**, compounds **A, B** and **C** show only weak activity against CDK2, but most of other compounds significantly overcome the CDK2 inhibition of roscovitine. Especially compounds **J** and **I** appear to be the most potent CDK2 inhibitors of this series with  $IC_{50}$ 's for CDK2 about 12-fold less than roscovitine.

**Table I.** CDK2 inhibitory effect of new roscovitine derivatives.

Compound	Rosc.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CDK2 inhibition ( $IC_{50}$ , nM)	180.0	>1000	>1000	817.5	173.3	95.7	91.5	50.7	48.5	21.0	9.2



**Figure 1.** Relative CDK2 inhibitory activity of new derivatives expressed as ratios of value of roscovitine's activity.

## ANTICANCER ACTIVITY

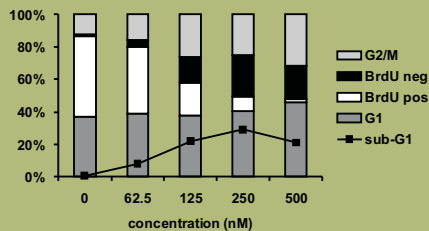
Anticancer activity of all compounds was tested against four human cancer cell lines (K562, MCF-7, G-361, HOS). As seen in **Table II.**, majority of inhibitors show much more strong anticancer activity than roscovitine. The most effective compounds **J** and **I** exert average value of  $IC_{50}$  in subnanomolar range (28 nM and 36 nM, respectively) and are about 650-fold lower than roscovitine.

**Table II.** Cytotoxicity of new derivatives of roscovitine.

Compound	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)			
	K562	MCF-7	G-361	HOS
Roscovitine	45.5	12.3	22.4	24.3
C	53.075	40.885	49.565	89.055
D	14.680	20.630	29.900	19.270
A	3.950	5.300	7.487	3.723
B	2.535	2.385	N/A	N/A
G	0.700	0.310	1.018	0.684
E	0.593	0.398	0.710	0.307
F	0.595	0.350	N/A	N/A
H	0.070	0.053	0.067	0.030
I	0.057	0.027	0.040	0.020
J	0.029	0.024	0.028	0.030

## CELL CYCLE ANALYSIS

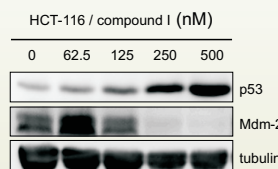
The antiproliferative activity of compound **I** was analyzed in asynchronously growing colon carcinoma cell line HCT-116 stained with propidium iodide (PI). As shown in **Figure 2.**, compound **I** arrested cells in G2/M phase (we observed almost twice more cells in G2/M phase after the treatment with 500 nM compared to control cells). Antiproliferative effect of compound **I** was confirmed by increased population of cells in sub-G1 phase. The effect of compound **I** on replication was analyzed by flow cytometric measurement of HCT-116 cells doubly stained with PI and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). As shown in **Figure 2.**, compound **I** decreased the population of cells actively replicating DNA (i.e. BrdU-positive cells) in a dose-dependent manner. At the dose of 250 nM compound **I** we observed markedly decreased replication to 9% value of control in HCT-116 cells. Higher concentration (500 nM) then caused total block of replication.



**Figure 2.** Flow cytometric analysis of cell cycle after propidium iodide staining in HCT-116 cell line treated with compound **I** for 24 hours.

## ACTIVATION OF TUMOR SUPPRESSOR P53

Expression and accumulation of tumor suppressor p53 is often associated with inhibition of CDKs. According to strong CDK2 inhibitory activity of our new compounds, we evaluated activation status of p53 upon treatment of colorectal carcinoma HCT-116 cells with one of the most effective inhibitor, compound **I**. Compound **I** rapidly increased the expression of p53 starting from 125 nM concentration (**Figure 3.**). Accumulation of p53 was accompanied with decreased expression of Mdm-2, which is a negative regulator of p53.

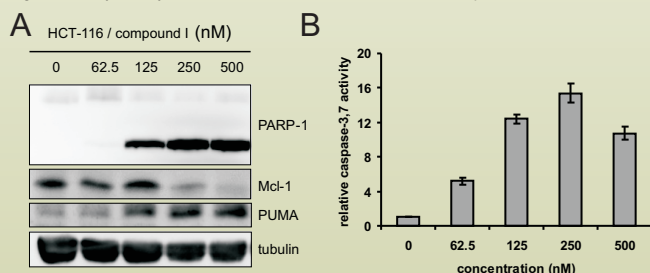


**Figure 3.** Analysis of p53 activation. Immunoblot analysis of expression of p53 and Mdm-2 in HCT-116 treated with compound **I** for 24 h. Tubulin level was detected to verify equal protein loading.

## INDUCTION OF APOPTOSIS

For the evaluation of apoptotic effects of compound **I** in HCT-116 cells we used immunoblotting analyses of some apoptotic markers (**Figure 4A.**) and fluorimetric-based caspase-3,7 activity assay. Expression of protein PUMA increased in dependence on concentration of compound **I** and the same trend was seen in the fragmentation of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-1). Induction of apoptosis upon the treatment of compound **I** was also verified by a gradual decrease of a level of anti-apoptotic protein Mcl-1.

The following results were complemented by caspase-3,7 enzyme activity assay. Activity of caspases-3,7 increased gradually after compound **I** treatment of HCT-116 cells (**Figure 4B.**). The highest activity of enzyme was seen at 250 nM concentration of compound **I**.

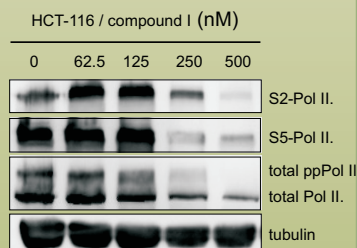


**Figure 4.** (A) Immunoblotting analysis of apoptotic markers in HCT-116 cells treated with compound **I** for 24 h. Tubulin levels were detected to verify equal protein loading. (B) Fluorimetric caspase-3,7 enzyme activity assay (based on cleavage of specific Ac-DEVD-AMC peptide substrate) in HCT-116 cells upon treatment with compound **I** for 24 h.

## EFFECT ON GENERAL TRANSCRIPTION

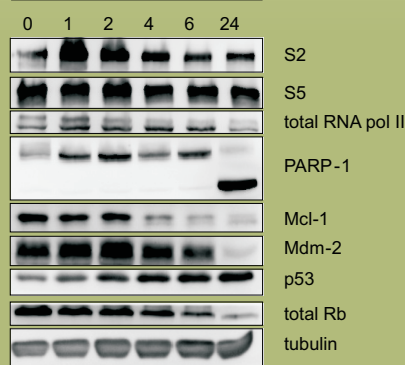
For the evaluation of transcription inhibition of compound **I** in HCT-116 cells we used immunoblotting analysis of dephosphorylation of RNA polymerase II at Ser2 and 5, respectively. Already at the dose of 250 nM of compound **I** we observed rapid decrease of transcription in HCT-116.

**Figure 5.** Effect of compound **I** (24 h treatment) on cellular transcription in HCT-116 cells. Immunoblotting analysis of dephosphorylation of RNA polymerase II at Ser2 and 5. Tubulin level was detected to verify equal protein loading.



## TIME-DEPENDENT EFFECT OF COMPOUND I

HCT-116 / compound **I** (h)



**Figure 6.** Time-dependent effect of compound **I** in HCT-116 cells.

For the evaluation of the time-dependent effect of compound **I** in HCT-116 cell line we treated cells with concentration of 250 nM. Then we analyzed expression of some selected proteins involved in transcription, cell cycle regulation and apoptosis by means of immunoblotting. As seen in **Figure 6.**, phosphorylation of RNA polymerase II slightly decreased after 2 hours as a level of tumor suppressor p53 increased. Decrease of cellular transcription caused decrease of protein level of short-half live protein Mcl-1, the important member of anti-apoptotic protein family. Changes in levels of other proteins (PARP-1, Rb) proceeded more slowly and their total elimination was observed up to 24 h treatment of compound **I**.

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



**Charakterizace protinádorových a protizánětlivých účinků  
nových nízkomolekulárních inhibitorů  
cyklin-dependentních kinas**

**Autoreferát disertační práce**

Mgr. Ladislava Vymětalová



Tato disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu oboru biochemie P1406 Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2011-2016. Školícím pracovištěm byla Laboratoř růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci & Ústavu experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

Uchazeč                    **Mgr. Ladislava Vymětalová**  
Laboratoř růstových regulátorů  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci

Školitel                    **doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**  
Laboratoř růstových regulátorů  
Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci

Oponenti                    **doc. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.**  
Ústav patologické fyziologie  
1. lékařská fakulta  
Univerzita Karlova v Praze

**prof. RNDr. et PhMr. Jan Kovařík, Dr.Sc.**  
Masarykův onkologický ústav v Brně

Obhajoba se koná dne ..... před komisí pro obhajoby disertačních prací v oboru biochemie v místnosti ..... Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci-Holici, Šlechtitelů 11. S disertační prací je možno se seznámit v knihovně biologických kateder PřF UP v Olomouci-Holici.

doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.  
předsedkyně oborové rady doktorského studijního programu biochemie

## **Abstrakt**

Cyclin-dependentní kinasy (CDK) regulují četné buněčné procesy, ovšem do povědomí vstoupily především jako regulátory buněčného cyklu. Poznávání molekulární podstaty nádorových onemocnění postupně odhalilo aberace ve struktuře či množství těchto enzymů vedoucí k deregulaci jejich aktivity. Z toho důvodu se CDK staly novým cílem protinádorových terapií. V rámci této práce byla provedena literární rešerše zabývající se vývojem inhibitorů CDK a konceptem syntetické letality, který by mohl pomoci při léčbě nádorových onemocnění. Jelikož je rakovina často úzce spjata s poruchami imunitního systému, byla část práce věnována zánětlivým chorobám, jejichž vznik je mnohdy spojený s nesprávnou funkcí či prodlouženou životností neutrofilů. V praktické části byly popsány účinky nových pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových inhibitorů CDK na nádorové linie, a navíc byl navržen i mechanismus jejich působení. Dále byl studován vliv nových inhibitorů na funkce neutrofilů a rovněž byl odhalen princip jejich účinků.

## **Abstract**

Cyclin-dependent kinases (CDK) control several cell processes but they are known especially as cell cycle regulators. Discovering of molecular principle of cancer has gradually revealed aberrations in the structure or amount of these enzymes leading to a deregulation of their activity. Hence, CDK came to the fore of many scientists and became a novel antitumor target. This study describes the development of CDK inhibitors and the concept of synthetic lethality which could help in anticancer therapies. Since a cancer is often linked to defects in immune system, a part of this dissertation was focused on inflammatory diseases which frequently arise from abnormal functions or prolonged viability of neutrophils. In practical section, the effects of novel pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines on cancer cell lines were described and the mechanism of their action was suggested. Further, an action of novel inhibitors on neutrophil functions was assessed and the principle of their activity was discovered.

## Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract .....	3
Obsah .....	4
1. Cíle práce .....	5
2. Úvod.....	6
3. Výsledky .....	7
3.1. 5-substituované 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H- pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidiny jako nové účinné CDK inhibitory s protinádorovým potenciálem .....	7
3.2. Trisubstituované pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidiny potlačují funkce neutrofilů a indukují jejich apoptosu.....	8
3.3. Nový syntetický nukleosid redukuje zánětlivé účinky neutrofilů .....	9
4. Závěr .....	11
5. Reference .....	12
6. Přehled publikační činnosti.....	14
7. Konferenční příspěvky.....	14

## 1. Cíle práce

Cílem předkládané práce bylo podat přehled o struktuře a funkcích CDK s důrazem na jejich deregulaci u mnoha nádorových onemocnění. Pravděpodobně nejjednodušším a nejefektivnějším způsobem potlačení aktivity těchto enzymů je aplikace nízkomolekulárních inhibitorů, a proto bylo dalším záměrem této disertace shrnout historii jejich vývoje od prvotních substancí izolovaných z přírodních materiálů až po nové převážně uměle vytvořené sloučeniny. Z praktického hlediska bylo cílem otestovat nové trisubstituované pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny na několika nádorových buněčných liniích a lidských neutrofilech, popsat vztahy mezi jejich strukturou a aktivitou a prostudovat mechanismus jejich buněčných účinků. Kromě těchto vytyčených cílů bylo dalším záměrem objasnit molekulární základ potlačení apoptosy neutrofilů pomocí nového syntetického nukleosidu.

## 2. Úvod

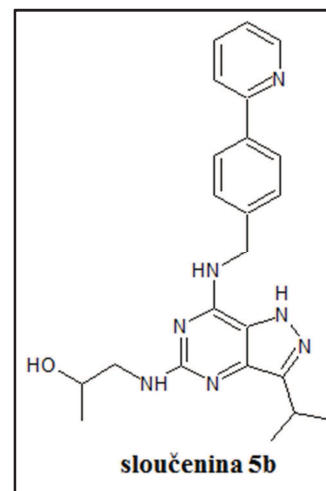
Počátky terapií nádorů spočívaly v chirurgickém zásahu a aplikaci ionizujícího záření či chemoterapeutik. Třebaže jsou tyto přístupy stále hojně využívány a mohou být efektivní u včasně diagnostikovaných malignit, zdá se nezbytné hledat nové účinnější přístupy, které specificky postihnou dané onemocnění a budou mít méně vedlejších účinků. Identifikace deregulovaných buněčných procesů a jejich komponent poskytuje cenné informace sloužící jako templát pro design nových efektivních biologických terapií. Pomocí nízkomolekulárních látek lze zasáhnout poškozené kontrolní mechanismy a vyvolat apoptosu nádorových buněk. Jedním z takových cílů jsou cyklin-dependentní kinasy (CDK) známé jako regulátory buněčného cyklu. Inhibice jejich aktivity byla prokázána jako velmi účinná protinádorová strategie a během posledních 25 let bylo nasyntetizováno mnoho sloučenin s inhibičním potenciálem vůči CDK. Několik látek dokonce postoupilo do klinických zkoušek, kde jsou aplikovány na různá nádorová onemocnění jak monoterapeuticky tak v kombinaci s klasickými cytostatiky. Laboratoř růstových regulátorů stála jakožto mateřské pracoviště za objevem klinicky testovaného CDK inhibitoru s názvem roskovitinu a stále se, kromě jiných vědeckých zaměření, intenzivně věnuje vývoji CDK inhibitorů a jejich uplatnění v léčbě maligních onemocnění.

Inhibice CDK aktivity může být ovšem využita v širším spektru chorob. Bylo zjištěno, že za vznikem a rozvojem chronických zánětlivých a autoimunitních onemocnění stojí extrémně dlouhé přežívání neutrofilů, které jsou nadměrně aktivovány a reagují vůči antigenům tělu vlastním. V konečném důsledku pak dochází k nevratnému poškození tkání a v extrémních případech jsou tato onemocnění i smrtelná. Několik studií prokázalo, že viabilita neutrofilů může být snížena aplikací nízkomolekulárních CDK inhibitorů, což podnítilo i naše snahy o nové uplatnění derivátů roskovitinu.<sup>1-3</sup>

### 3. Výsledky

#### 3.1. 5-substituované 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2H)-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny jako nové účinné CDK inhibitory s protinádorovým potenciálem

Ve snaze vyvinout analoga roskovitinu se zlepšenými CDK inhibičními vlastnostmi a silnější antiproliferační aktivitou jsme se zaměřili na modifikaci pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinového skeletu, jelikož bylo již dříve prokázáno, že překonává účinky příslušných purinových sloučenin.<sup>4,5</sup> Všechny látky byly následně testovány na inhibici CDK2 a CDK5. Z naměřených hodnot IC<sub>50</sub> je patrné, že substituent v poloze 5 značně přispívá ke zvýšené účinnosti pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu. Nejvýhodnějším řetězcem se pak jeví hydroxyalkylamin a aminoalkylamin. Následně jsme porovnali jednu z neaktivnějších substancí **5b** (Obrázek 1)



Obrázek 1 Chemická struktura sloučeniny **5b**

s dinaciclibem v inhibici několika CDK. Naše sloučenina **5b** vykázala podobný inhibiční profil jako dinaciclib s nižší účinností pro CDK1. Na panelu 50 dalších proteinkinas se ukázalo, že **5b** efektivně blokuje také PAK4 (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4) a CK1δ (casein kinase 1δ), které jsou cíli jak strukturně podobných purinů tak i dalších pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů.<sup>5-8</sup>

U všech derivátů jsme dále sledovali jejich antiproliferační vlastnosti na 4 nádorových liniích různého původu. Bylo prokázáno, že zavedení substituce do polohy 5 znatelně zlepšuje protinádorové účinky dané sloučeniny. Nejefektivnější byly v našich testech opět sloučeniny s hydroxyalkylaminovým resp. aminoalkyllovým řetězcem. Pro zjištění mechanismu účinku nejúčinnější látky **5b** jsme využili buněčný model kolorektálního karcinomu. Analýza buněčného cyklu ukázala, že došlo k nárůstu počtu buněk převážně v G2/M fázi a zároveň vzrostla subG1 populace. Biochemickými testy byl odhalen pokles antiapoptotického proteinu Mcl-1 a zvýšená aktivace kaspas 3 a 7. Indukce vnitřní apoptotické dráhy naší látkou **5b** byla dále potvrzena i detekcí štěpného fragmentu PARP-1. **5b** blokuje též aktivitu CDK7 a CDK9, neboť potlačila fosforylaci CTD domény RNA polymerasy II na Ser2 i Ser5 u buněk odvozených od melanomu. V neposlední řadě patří mezi molekulární cíle naší látky také CDK5, což bylo

prokázáno sníženou fosforylací FAK (focal adhesion kinase) u buněk odvozených od kolorektálního karcinomu.

### **3.2. Trisubstituované pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny potlačují funkce neutrofilů a indukují jejich apoptosu**

Nedávné studie naznačily, že by CDK inhibitory mohly být využitelné při léčbě chronických zánětlivých i autoimunitních onemocnění. Při studiu účinků roskovitinu na funkce neutrofilů se totiž ukázalo, že při jeho aplikaci dochází k indukci apoptosy prostřednictvím blokování funkcí RNAPII (RNA polymerase II) vedoucí ke snížené expresi Mcl-1, tvorbě pórů v mitochondriální membráně, uvolnění cytochromu *c*, formování apoptosomu a aktivaci kaspas.<sup>9</sup>

Pro studium proapoptotických účinků jsme vytvořili knihovnu 42 derivátů roskovitinu, kterými byly ovlivněny neutrofilly izolované z krve zdravých dárců. Analýzou apoptotických populací pomocí průtokového cytometru byly vyselektovány dvě nejúčinnější sloučeniny LGR3437 a LGR3465, u nichž byl následně zkoumán mechanismus působení. Po ovlivnění neutrofilů oběma sloučeninami v závislosti na koncentraci postupně klesala hladina fosforylovaných forem RNAPII na Ser2 a Ser5 a stejně tak i proteinu Mcl-1. Při detekci Mcl-1 byl kromě klesající formy pozorován nárůst těžšího proteinového pásu. Možným vysvětlením tohoto jevu může být detekce fosforylované varianty Mcl-1 na Thr163/Ser159 v jeho PEST sekvenci vedoucí k degradaci celého proteinu.<sup>10-12</sup>

I když obě sloučeniny indukují apoptosu neutrofilů, jejich využití jako protizánětlivých léků závisí na schopnosti potlačovat účinky molekul prodlužujících přežívání neutrofilů. Vzhledem ke zvýšené hladině GM-CSF u mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění byl pro následující experimenty použit právě tento cytokin. Při použití obou látek u neutrofilů stimulovaných GM-CSF došlo k nárůstu podílu apoptotických buněk. V dalším experimentu ve stejném uspořádání byla analyzována exprese Mcl-1 pomocí imunoblotu. Aplikace LGR3437 i LGR3465 způsobila rapidní pokles lehčí varianty Mcl-1 a zároveň postupný nárůst těžšího pásu. Kromě potlačení viability neutrofilů byla též sledována schopnost obou sloučenin tlumit jejich aktivitu. Aplikace obou sloučenin potlačila produkci ROS (reactive oxygen species) neutrofilly ovlivněnými GM-CSF, a navíc stimulovanými chemotaktickým faktorem fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine).

### 3.3. Nový syntetický nukleosid redukuje zánětlivé účinky neutrofilů

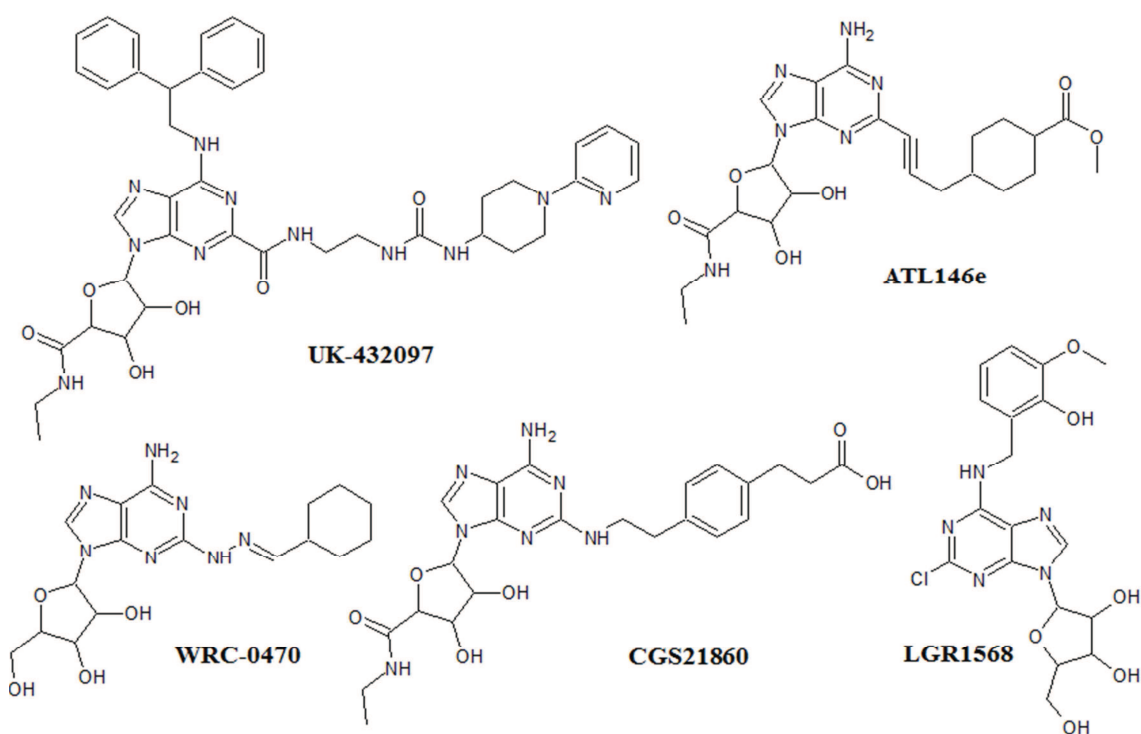
Přirozená odpověď organismu na nadměrnou imunitní reakci zahrnuje mezi jinými endogenní produkci adenosinu, který se následně váže na 4 typy receptorů spřažených s G proteiny, jmenovitě A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub>.<sup>13</sup> Během zánětu rapidně stoupá koncentrace adenosinu a dochází k aktivaci A<sub>2A</sub> stimulační funkce adenylátcyklasy.<sup>14-16</sup> Tyto změny pak vedou k potlačení zánětlivých efektů včetně degranulace, adheze či syntézy leukotrienů.<sup>14</sup> Vzhledem k nestabilitě adenosinu a jeho nežádoucím účinkům je nasnadě vyvíjet analoga specificky aktivující určitý typ receptoru. A<sub>2A</sub> prezentující hlavní typ protizánětlivého efektoru neutrofilů vyvolal zájem vědců o vývoj jeho agonistů, mezi které se řadí například CGS21680, UK-432097, WRC-0470 nebo ATL146e (**Obrázek 2**). Cílem této studie bylo charakterizovat účinky nově vyvinutého derivátu adenosinu LGR1568 na funkce neutrofilů a objasnit mechanismus jeho působení. Tato sloučenina byla nedávno popsána jako syntetický modulátor životaschopnosti neutrofilů (patent WO2010130233).<sup>17</sup>

Schopnost neutrofilů adherovat k vaskulárnímu endotelu a migrovat z krve do tkání je prvním krokem v zánětlivém procesu, jehož potlačení může napomoci při léčbě. V kapilárním systému napodobujícím *in vivo* vaskulaturu. LGR1568 mírně potlačovala adhezi neutrofilů, snižovala jejich transmigraci a zároveň podporovala kutálení. V dalším experimentu byly neutrofilové ovlivněny GM-CSF a LGR1568 a po stimulaci fMLP byla sledována produkce ROS, která v závislosti na koncentraci LGR1568 postupně klesala. Podobně byla potlačena i produkce zánětlivého cytokinu IL-8 a uvolnění myeloperoxidasy. Kromě ovlivnění funkcí neutrofilů byl sledován vliv LGR1568 na jejich viabilitu pomocí GIEMSA barvení a světelné mikroskopie, kdy se ukázalo, že LGR1568 zvyšuje viabilitu buněk, a to opět v koncentračně závislém množství.

Za prodloužením viability neutrofilů by mohla podle literatury stát aktivace adenosinového A<sub>2A</sub> receptoru. Za účelem objasnění této hypotézy byla analyzována vazebná afinita LGR1568 k receptorům A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> a A<sub>3</sub> (provedla skupina doktora Jacobsona KA, USA). Z výsledků plyne, že se LGR1568 váže na všechny testované receptory s afinitou vůči A<sub>3</sub> a A<sub>1</sub> (nM) a v mikromolárních koncentracích k A<sub>2A</sub>. Vzhledem k dominantní expresi A<sub>3</sub> a A<sub>2A</sub> neutrofilů a zároveň mikromolárním koncentracím použitým v našich experimentech jsme se zaměřili na možnost zacílení A<sub>2A</sub> pomocí LGR1568. Neutrofilové byly ovlivněny komerčními agonisty A<sub>2A</sub>, LGR1568,



a to buď samostatně nebo v kombinaci s antagonistou  $A_{2A}$ . Analýza apoptotických populací pomocí průtokového cytometru ukázala, že agonisté i LGR1568 zvyšují viabilitu neutrofilů, která je potlačena v přítomnosti antagonisty. Na základě tohoto faktu je zřejmé, že došlo ke kompetitivní reakci, při které antagonistista vytěsnil testovanou sloučeninu.



**Obrázek 2** Chemické struktury vybraných  $A_{2A}$  agonistů.

## 4. Závěr

Výstupem této práce bylo několik poznatků týkajících se objasnění mechanismu účinků několika nízkomolekulárních látek. U nově vyvinutých pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů byly na buněčných modelech prokázány protinádorové efekty, které byly podstatně silnější než u mateřského roskovitinu. I když se jedná o panselktivní inhibitory, předpokládáme, že hlavní podíl na aktivitě těchto látek má inhibice CDK2 a CDK7 společně s CDK9 kontrolující transkripci. Další ze série pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů indukovaly apoptosu neutrofilů. Navíc byly schopné překonat i účinky prozánětlivých cytokinů, a mohly by se tudíž stát kandidáty pro další testování. Podobně jako u předchozích sloučenin dochází po aplikaci těchto látek k inhibici transkripčních CDK, které jsou esenciální pro viabilitu neutrofilů. V neposlední řadě byl naznačen mechanismus účinku adenosinového derivátu s antiapoptotickým vlivem na neutrofilů zahrnující aktivaci A<sub>2A</sub> receptoru.

## 5. Reference

- <sup>1</sup>Leitch AE, Riley NA, Sheldrake TA, Festa M, Fox S, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010) The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol* **40**, 1127-38.
- <sup>2</sup>Leitch AE, Lucas CD, Marwick JA, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2012) Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death Differ* **19**, 1950-61.
- <sup>3</sup>Wang K, Hampson P, Hazeldine J, Kryštof V, Strnad M, Pechan P, M J (2012) Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS One* **7**, e30128.
- <sup>4</sup>Jorda R, Havlíček L, McNae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Šturc A, Navrátilová J, Kuzma M, Mistřík M, Bártek J, Strnad M, Kryštof V (2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem* **54**, 2980-93.
- <sup>5</sup>Řezníčková E, Weitensteiner S, Havlíček L, Jorda R, Gucký T, Berka K, Bazgier V, Zahler S, Kryštof V, Strnad M (2015) Characterization of a Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases 2 and 5 and Aurora A With Pro-Apoptotic and Anti-Angiogenic Activity In Vitro. *Chem Biol Drug Des* **86**, 1528-40.
- <sup>6</sup>Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **27**, 5797-807.
- <sup>7</sup>Sroka IM, Heiss EH, Havlíček L, Totzke F, Aristei Y, Pechan P, Kubbutat MH, Strnad M, Dirsch VM (2010) A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **77**, 255-61.
- <sup>8</sup>Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard ML, Myrianthopoulos V, Mikros E, Flajolet M, Greengard P, Meijer L, Galons H (2008) Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J Med Chem* **51**, 5229-42.
- <sup>9</sup>Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, Martinez-Losa M, Walker TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin MC, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Med* **12**, 1056-64.
- <sup>10</sup>Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H (2002) Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**, 43730-4.
- <sup>11</sup>Ding Q, He X, Hsu JM, Xia W, Chen CT, Li LY, Lee DF, Liu JC, Zhong Q, Wang X, Hung MC (2007) Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* **27**, 4006-17.

- <sup>12</sup>Ding Q, Huo L, Yang JY, Xia W, Wei Y, Liao Y, Chang CJ, Yang Y, Lai CC, Lee DF, Yen CJ, Chen YJ, Hsu JM, Kuo HP, Lin CY, Tsai FJ, Li LY, Tsai CH, Hung MC (2008) Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer Res* **68**, 6109-17.
- <sup>13</sup>Linden J (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 775-87.
- <sup>14</sup>Barletta KE, Ley K, Mehrad B (2012) Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 856-64.
- <sup>15</sup>Sottofattori E, Anzaldi M, Ottonello L (2001) HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J Pharm Biomed Anal* **24**, 1143-6.
- <sup>16</sup>Cronstein BN, Kramer SB, Weissmann G, Hirschhorn R (1983) Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Exp Med* **158**, 1160-77.
- <sup>17</sup>Siller M, Anzenbacher P, Anzenbacherová E, Doležal K, Strnad M (2011) In vitro interaction of a novel neutrophil growth factor with human liver microsomal cytochromes P450 and the contribution of UDP-glucuronosyltransferases to its metabolism. *Xenobiotica* **41**, 934-44.

## 6. Přehled publikační činnosti

1. **Vymětalová L**, Kryštof V (2015) Potential Clinical Uses of CDK Inhibitors: Lessons from Synthetic Lethality Screens. *Med Res Rev* **35**, 1156-74.
2. **Vymětalová L**, Havlíček L, Štunc A, Skrášková Z, Jorda R, Pospíšil T, Strnad M, Kryštof V (2016) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur J Med Chem* **110**, 291-301.

## 7. Konferenční příspěvky

1. Jorda R, Zatloukal M, Řezníčková E, **Vymětalová L**, Kryštof V, Strnad M: Novel derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Cell cycle Regulators/Inhibitors and Cancer*, Feb 5-8, 2011, Vienna, Austria.
2. **Vymětalová L**, Havlíček L, Jorda R, Kryštof V, Strnad M: Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidine derivatives of cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Molecular Insights for Innovative Therapies*, Dec 1-3, 2011, Heidelberg, Germany.