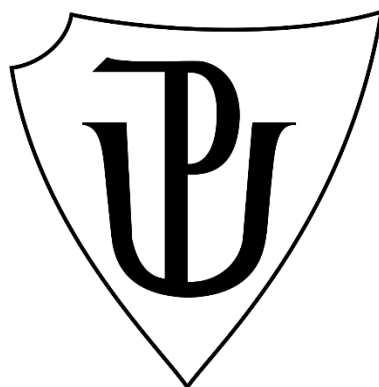


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava nových CDK4 inhibitorů  
s dihydropteridinovým skeletem modifikovaným  
v poloze 2**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tomáš Daniel</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Monika Tomanová</b>
Rok:	2024

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

## Poděkování

Mé poděkování patří především Mgr. Monice Tomanové za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla během vykonávání bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat panu doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. a celé výzkumné skupině za jejich vstřícnost a za vytvoření příjemného prostředí v laboratoři. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Ing. Václavovi Bazgierovi, Ph.D. za pomoc s molekulovým dockingem a Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za pomoc s biologickým testováním. Mé poděkování náleží samozřejmě i mé rodině a přátelům za jejich podporu.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tomáš Daniel
Název práce	Příprava nových CDK4 inhibitorů s dihydropteridinovým skeletem modifikovaným v poloze 2
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Monika Tomanová
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zaměřuje syntézu nových dihydropteridinových derivátů lišících se od sebe substituentem v poloze 2. Teoretická část je zaměřená na cyklin-dependentní kinasy a jejich inhibitory, molekulový docking a syntézu cílových sloučenin. Praktická část pojednává především o designu a přípravě cílových látek. Je zde také rozebrán molekulový docking navržených látek a biologické testování připravených derivátů na buněčných liniích a vybraných enzýmech.

Klíčová slova	Cyklin-dependentní kinasy, dihydropteridin, molekulový docking
Počet stran	48
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tomáš Daniel
Title	Preparation of new CDK4 inhibitors with a dihydropteridine skeleton modified at position 2
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Monika Tomanová
The year of presentation	2024

### Abstract:

This bachelor thesis focuses on the synthesis of new dihydropteridine derivatives differing from each other by substituent in position 2. The theoretical part is focused on cyclin-dependent kinases and their inhibitors, molecular docking and synthesis of target compounds. The practical part deals mainly with the design and preparation of target substances. Molecular docking of designed substances and biological testing of prepared derivatives on cell lines and selected enzymes are also discussed in this part.

Keywords	Cyclin-dependent kinases, dihydropteridine, molecular docking.
Number of pages	48
Number of appendices	1
Language	Czech

## OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky .....	2
2.1	Cyklin-dependentní kinasy .....	2
2.2	CDK inhibitory v léčbě rakoviny.....	3
2.3	Molekuly s pteridinovým skeletem.....	8
2.4	Molekulový docking .....	13
3	Výsledky a diskuze .....	15
3.1	Design cílových látek a návrh syntézy.....	15
3.2	Příprava intermediátu <b>23</b> .....	16
3.3	Využití aminoderivátu <b>23</b> pro syntézu finálních látek.....	19
3.4	Příprava finálních derivátů.....	23
3.5	Molekulový docking .....	29
3.6	Biologická aktivita .....	32
4	Experimentální část.....	33
4.1	Obecné metody.....	33
4.2	Syntéza 2-amino-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dionu <b>23</b> .....	33
4.3	Syntéza finálních derivátů.....	37
5	Závěr .....	43
6	Literatura.....	44
7	Seznam použitých symbolů a zkratk.....	48
8	Přílohy.....	49

## CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce je příprava nových dihydropteridinových derivátů lišících se od sebe substituentem v poloze 2.

Cílem teoretické části je provedení rešerše v oblasti cyklin-dependentních kinas a jejich inhibitorů a syntézy cílových sloučenin.

Praktická část si klade za cíl připravit navržené látky a také je plně charakterizovat pomocí standardních metod jako  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, HRMS a teploty tání. Dále je cílem navržené molekuly prozkoumat, jak se mohou vázat do vazebného místa, a to v rámci molekulového dockingu.

Všechny připravené látky posléze otestovat na jejich biologickou aktivitu na buněčných liniích (MV4-11, K562, MCF-7) a vybraných enzymech (CDK2/E, CDK4/D1 a FLT3-ITD).

## 1 ÚVOD

Buněčný cyklus je komplexní proces nezbytný pro růst a proliferaci buněk, vývoj organismu, regulaci oprav poškozené DNA, tkáňové hyperplazie jako reakce na poranění a nemoci, jako je rakovina. Buněčný cyklus je regulován řadou proteinů, které vedou buňku až k mitóze a produkci dvou dceřiných buněk. Mezi hlavní řídicí enzymy buněčného cyklu patří cyklin-dependentní kinasy (CDK, EC 2.7.11.22) společně s proteiny cykliny, které regulují chod buněčného cyklu jednotlivými fázemi (Schafer, 1998).

Bylo zjištěno, že mnoho genetických a epigenetických změn (mutace nebo zvýšená exprese) mohou způsobit hyperaktivaci CDK a cyklinů. To poté ve výsledku vede ke vzniku maligních buněk a vzniku rakoviny. Abnormální regulace aktivity CDK byla identifikována u různých typů rakoviny a byla způsobena několika mechanismy. Proto jsou tyto kinasy slibný cíl pro vývoj nových léčiv proti rakovině (Chohan et al., 2018). Z tohoto důvodu bylo za posledních 20 let vyvinuto mnoho molekul jako potencionální inhibitory CDK, které byly testovány v klinických studiích (Zhang et al., 2021).

CDK inhibitory první a druhé generace byly pro jejich nízkou selektivitu a cytotoxicitu vůči normálním buňkám nakonec neúspěšné v klinických studiích. Avšak tři inhibitory třetí generace, které selektivně inhibují CDK4/6 oproti ostatním CDK, obdržely regulační schválení pro léčbu pacientek s rakovinou prsu. Bohužel se ale začínají objevovat případy rozvoje rezistence vůči těmto inhibitorům. Z toho důvodu je důležité objevit příčiny vzniku rezistencí a neustále vyvíjet nové inhibitory. (Yuan et al., 2021).



## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Cyklin-dependentní kinasy

Cyklin-dependentní kinasy jsou proteiny důležité k regulaci a expresi velkého množství složek nezbytných pro chod buněčného cyklu (Roskoski, 2019). Buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází: G1, S, G2 a M. Přejíchy mezi těmito fázemi jsou regulovány různými CDK společně s cykliny, které zajišťují normální chod celého cyklu (Yuan et al., 2021). CDK tvoří heterodimerní komplexy skládající se z podjednotky katalytické kinasy a podjednotky cyklinu. Tyto enzymy řadíme do podrodiny Serin/Threonin proteinkinás (Malumbres & Barbacid, 2005). Cykliny jsou regulační podjednotky, které řídí aktivitu kinás a substrátovou specifitu (Lim & Kaldis, 2013). U lidí se nachází 20 různých cyklin-dependentních kinás (CDK1 – CDK20) a 13 skupin cyklinů (A, B, C, D, E, F, G, H, J, K, L, T a Y) (Roskoski, 2019).

Většina CDK je tvořena z přibližně 300 aminokyselinových zbytků a má molekulovou hmotnost kolem 35 kDa. CDK11 je o něco větší a to s 800 aminokyselinovými zbytky a molekulovou hmotností 110 kDa. CDK12 a CDK13 jsou oproti ostatním mnohem větší. Jsou tvořeny asi 1500 aminokyselinovými zbytky a dosahují hmotnosti kolem 165 kDa. Lidské cykliny jsou proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 35–90 kDa (Malumbres, 2014; Roskoski, 2019). Tyto proteiny obsahují doménu 100 aminokyselinových zbytků sestávající se z pěti  $\alpha$ -helixů, která se nazývá cyklinový box. Cykliny A, B, C, D, E, F a J obsahují dva cyklinové boxy, zatímco ostatní pouze jeden (Roskoski, 2019).

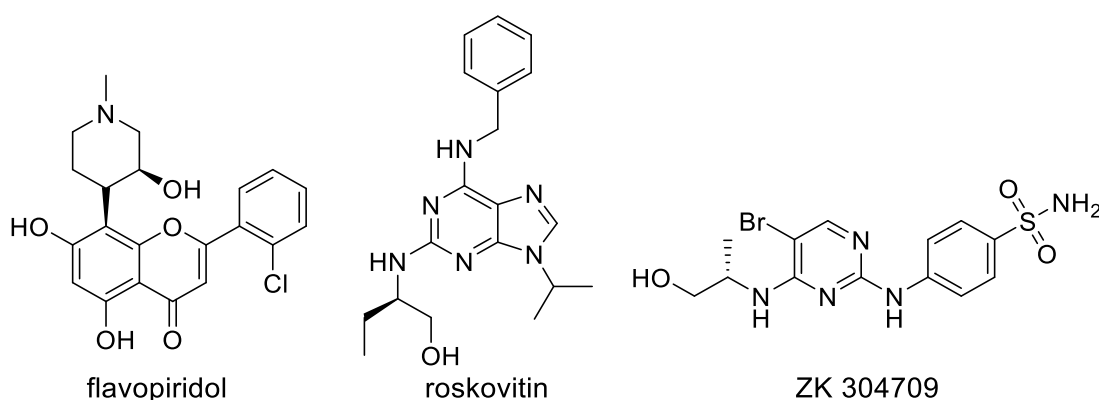
CDK mají stejně jako ostatní kinasy strukturu složenou ze dvou domén. N-terminální konec je tvořen hlavně z  $\beta$ -skládaných listů, C-terminální konec z  $\alpha$ -helixů a mezi ně je vmezeřena katalytická štěrbina tvořena ATP vazebným místem. N-konec obsahuje tzv. G-smyčku bohatou na glycin a unikátní helix, nazývaný také jako C-helix. Součástí C-konce je aktivační segment, nazývaný také jako T-smyčka, který je fosforylován při aktivaci enzymu. V monomerní formě CDK bez navázaného cyklinu jsou C-helix N-konce a aktivační segment C-konce blízko sebe, čímž je katalytická štěrbina nepřístupná. Po navázání cyklinu dochází k odtažení C-helixu od aktivačního segmentu, díky čemuž se stává katalytická štěrbina přístupná. Tato konformace je udržena fosforylací threoninového zbytku (Lim & Kaldis, 2013; Malumbres, 2014).

Cykliny jsou syntetizovány a degradovány ve specifických časech v průběhu buněčného cyklu, čímž se reguluje aktivita kinás (Malumbres & Barbacid, 2009). CDK

interagují s cykliny v prvním kroku aktivace kinas. Po vytvoření CDK-cyklin komplexu dojde k fosforylaci CDK (katalyzována CDK7) aktivačního segmentu na konzervovaném threoninovém zbytku, což vede k plné aktivaci CDK-cyklin komplexů (Roskoski, 2019). Lidské buňky obsahují mnoho genů, které kódují CDK a cykliny, avšak pouze určitá podskupina CDK-cyklin komplexů se přímo podílí na řízení buněčného cyklu. Mezi ně náleží tři interfázové CDK (CDK2, CDK4 a CDK6), mitotická CDK1 a deset cyklinů patřících do čtyř různých skupin (A, B, D a E). Poruchy buněčného cyklu spojené s tvorbou nádorů jsou často právě způsobeny změnami v aktivitě CDK (Malumbres & Barbacid, 2009).

## 2.2 CDK inhibitory v léčbě rakoviny

Vzhledem k důležité funkci CDK při regulaci buněčného dělení, ale také genové transkripce a jiných biologických procesů, byly vyvinuty inhibitory CDK pro léčbu různých onemocnění způsobených abnormalitami u CDK. Za posledních 20 let se objevilo mnoho sloučenin fungujících jako inhibitory CDK a byly hodnoceny v klinických studiích (Zhang et al., 2021). S výjimkou flavopiridolu, roskovitinu a ZK 304709 (Obr. 1), které jsou deriváty přírodních látek, je většina z nich čistě syntetická (Krystof & Uldrijan, 2010).

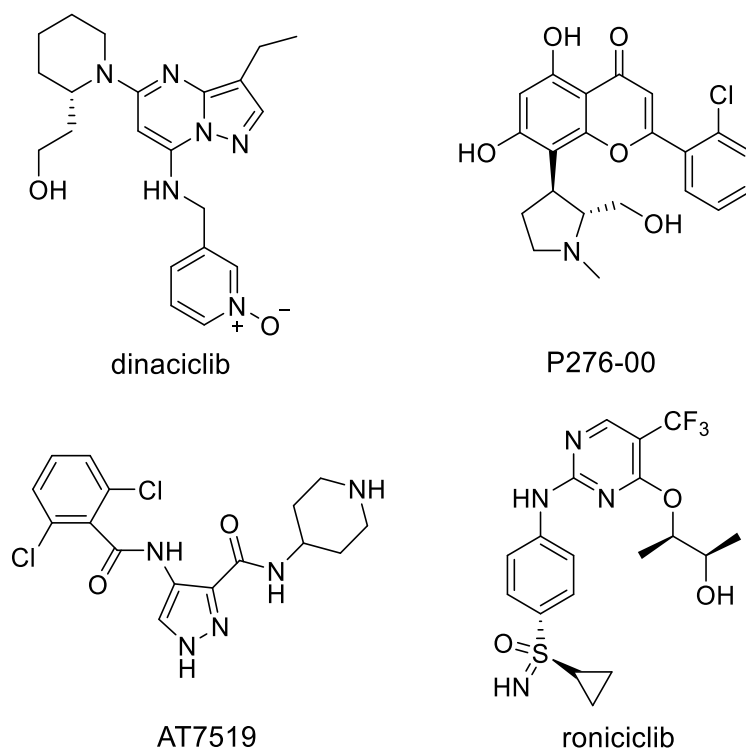


Obr. 1: Chemické struktury polosyntetických CDK inhibitorů.

První generace CDK inhibitorů jsou takzvané pan-CDK inhibitory, kam patří již zmíněný flavopiridol a roskovitin. Nicméně tato generace pan-CDK inhibitorů často měla špatnou selektivitu a vysokou toxicitu (Cicenas et al., 2015; Meijer et al., 1997; Whittaker et al., 2017). Z těchto látek je nejvíce prozkoumán flavopiridol, který inhibuje CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 a CDK9. Tento derivát byl původně připraven z rohikutinu, což je chromonový alkaloid, a byl prvním CDK inhibitorem, který byl použit v klinických studiích na lidech. Přestože flavopiridol dokáže zastavit chod G1 a G2 fáze, vyvolává

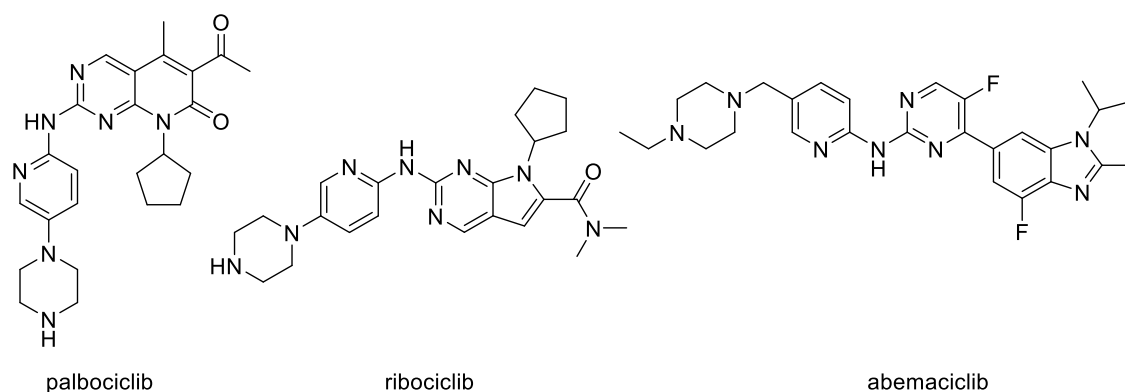
také cytotoxickou odpověď, pravděpodobně kvůli inhibici CDK7 a CDK9, což vede k potlačení transkripce (Asghar et al., 2015; Bose et al., 2013).

Následná druhá generace CDK inhibitorů, mezi které patří například dinaciclib, P276-00, AT7519, roniciclib atd. (Obr. 2), byla vyvinuta s lepší selektivitou a s menším množstvím vedlejších efektů. Většina z nich účinně fungovala proti rakovině v preklinických testech, ale jejich bezpečnost a účinnost musí být stále ověřena v klinických studiích (Zhang et al., 2021). Z této druhé generace byl nejvíce klinicky zkoumán dinaciclib, který byl vyvinut jako vysoce účinný inhibitor CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 (s hodnotami inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) v rozmezí 1–4 nM) s menší aktivitou vůči CDK4, CDK6 a CDK7 (hodnoty  $IC_{50}$  v rozmezí 60–100 nM). Nicméně výsledky klinických studií fáze II byly zklamáním. Zlepšení selektivity vůči určitým CDK se jeví jako klíčový krok pro vyvinutí léčiv proti rakovině (Asghar et al., 2015).



Obr. 2: Chemické struktury vybraných CDK inhibitorů druhé generace.

Třetí generace CDK inhibitorů již oproti předchozím selektivně inhibuje CDK4/6 se silnou účinností a sníženou toxicitou a jedná se o nejslibnější třídu inhibitorů (Asghar et al., 2015). Tři látky třetí generace inhibitorů (palbociclib, ribociclib a abemaciclib) (Obr. 3) vykazují selektivitu vůči CDK4/6 oproti jiným CDK a obdržely regulační schválení od U.S. Food and Drug Administration (FDA) pro léčbu pacientů s rakovinou prsu (Yuan et al., 2021).



Obr. 3: Chemické struktury schválených CDK inhibitorů třetí generace.

### 2.2.1 CDK4 a CDK6 inhibitory

CDK4 a CDK6 jsou si svými biochemickými a biologickými vlastnostmi velmi podobné. Obě mohou být aktivovány D-cykliny, které jsou rozhodujícími iniciátory přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu (Diehl, 2002; Yuan et al., 2021).

Jedním z kritických substrátů je retinoblastomový protein (pRb), jenž v hypofosforylovaném stavu blokuje průběh G1 fáze jako represor transkripčního faktoru E2F (Krystof & Uldrijan, 2010). Komplex CDK4/6 - cyklin D fosforyluje retinoblastomový protein, který se po fosforylaci váže do trans-aktivační domény (Matsushime et al., 1994). E2F transkripční faktor je poté uvolněn a dochází k expresi E-cyklinů, které interagují s CDK2 (Burkhart & Sage, 2008; Hinds, 1995; Yuan et al., 2021). CDK2-cyklin E komplex dále urychluje fosforylaci pRb, čímž snižuje represí E2F faktoru a usnadňuje přechod z G1 do S fáze (Knudsen & Witkiewicz, 2017). Zvýší-li se hladina D-cyklinu nebo aktivita CDK4/6, dojde k hyperaktivaci komplexu CDK4/6 – cyklin D, čímž se zrychlí přechod z G1 fáze do S fáze. Toto urychlení buněčného cyklu vede k nekontrolovanému buněčnému dělení a vzniku rakoviny. Právě proto inhibice CDK4/CDK6 může způsobit zastavení G1 fáze buněčného cyklu a je slibnou a efektivní strategií pro léčbu rakoviny (Yuan et al., 2021).

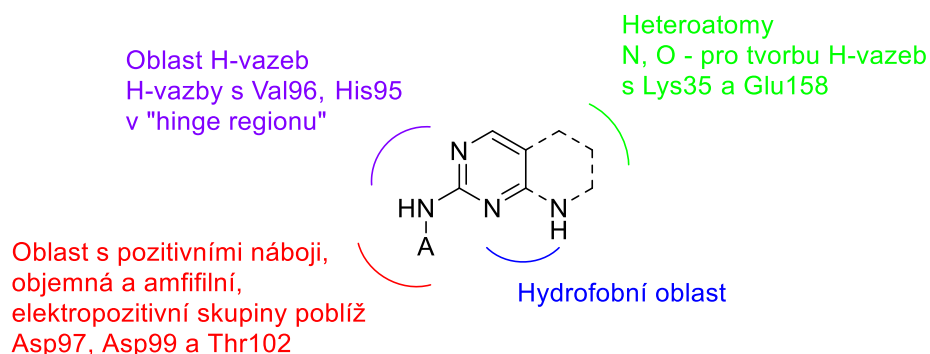
Palbociclib je historicky první perorálně podávaný, reverzibilní a selektivní inhibitor CDK4/6, který byl vyvinut firmou Pfizer pro léčbu rakoviny. CDK4/6 dokáží vázat cyklin D1, což vede k hyperfosforylaci pRb. Palbociclib dokáže separovat CDK4/6 cyklin D1 komplexy, čímž blokuje fosforylaci pRb a brání uvolnění E2F faktoru, díky čemuž dojde k zastavení G1 fáze a k potlačení růstu nádoru (Liu et al., 2018). Toto léčivo bylo v roce 2015 ve Spojených státech schváleno pro léčbu žen s lokálně pokročilou nebo metastatickou rakovinou prsu. Palbociclib se běžně podává společně s léčivem letrozol

(Dhillon, 2015). Léčivo letrozol se řadí mezi nesteroidní inhibitory aromatasy (IA, EC 1.14.14.14) a využívá se pro inhibici aromatasy v periferních tkáních a potlačení hladiny estrogenu, jehož zvýšená hladina v periferních tkáních zvyšuje riziko rakoviny (Bhatnagar, 2007; Lamb & Adkins, 1998). Ve studii PALOMA-2 bylo prokázáno, že léčba palbociclibem společně s letrozolem vede k významně delšímu přežití bez progresu, než při léčbě se samotným letrozolem (Finn et al., 2016).

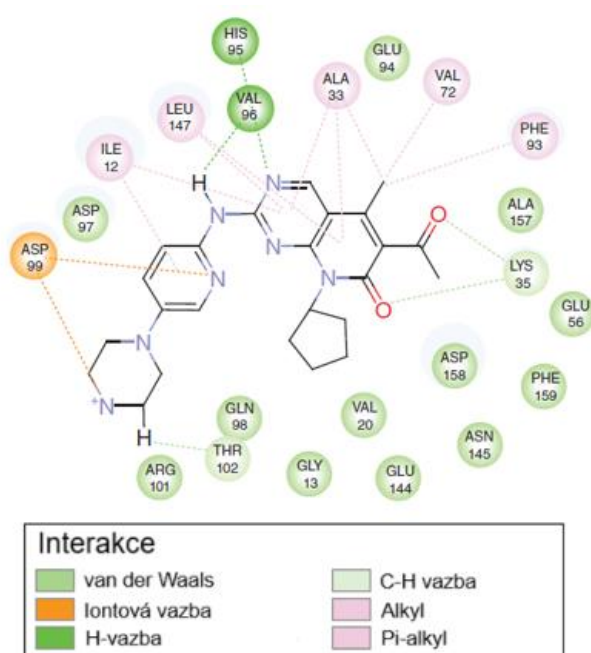
Ribociclib je látka, která byla vyvinuta firmou Novartis pro léčbu rakoviny. Stejně jako palbociclib, je ribociclib inhibitor CDK4/6, který byl v roce 2017 ve Spojených státech schválen pro léčbu rakoviny prsu v kombinaci s letrozolem (Syed, 2017).

Abemaciclib je poslední ze schválených perorálně podávaných CDK4/6 inhibitorů. Z těchto tří léčiv je to nejméně specifický inhibitor a ukázal se být aktivní vůči 29 různým druhům lidských kinas (Chen et al., 2016; Poratti & Marzaro, 2019). Tato látka, která byla vyvinuta firmou Eli Lilly and Company, taktéž obdržela schválení v roce 2017 pro léčbu rakoviny prsu v kombinaci s látkou fulvestrant (Kim, 2017). Fulvestrant je selektivní antagonist estrogenového receptoru (ER), který se využívá při léčbě ER-pozitivních karcinomů prsu (Bross et al., 2002). Po provedení studie MONARCH 2 bylo demonstrováno, že abemaciclib v kombinaci s letrozolem zlepšuje přežití bez progresu u pacientek s rakovinou prsu, které již prošly endokrinní terapií (Sledge et al., 2017).

Při porovnání struktur mezi CDK4, CDK6 a CDK2 se ukázalo, že jejich podobnost přesahuje 60 %. Na základě výzkumu struktur již připravených inhibitorů CDK4/6 a inhibitorů CDK2 a jejich interakcí s aktivním místem enzymů bylo navrženo, že selektivní CDK4/6 inhibitory by měly mít pět strukturálních vlastností. Součástí molekuly inhibitoru by měl být donor a akceptor vodíkové vazby, pozitivní náboj a dvě hydrofobní části. Dále se ukázalo, že vyvinuté inhibitory CDK2 splňují pouze čtyři z těchto pěti vlastností, protože neobsahují část s pozitivním nábojem, což může být využito při návrhu nových selektivních CDK4/6 inhibitorů (Chen et al., 2020). Strukturální požadavky pro přípravu selektivních CDK4 inhibitorů navržené podle interakcí již připravených inhibitorů jsou znázorněny na Obr. 4. Tyto strukturální požadavky byly vybrány jako nejvhodnější podle molekulového dockingu palbociclibu a CDK4 (Obr. 5).



Obr. 4: Hlavní strukturální požadavky pro CDK4 inhibitory. Převzato od Chen et al., 2020.



Obr. 5: 2D reprezentace interakcí CDK4-palboiciclib. Převzato od Chen et al., 2020.

### 2.2.1.1 Rezistence vůči CDK inhibitorům

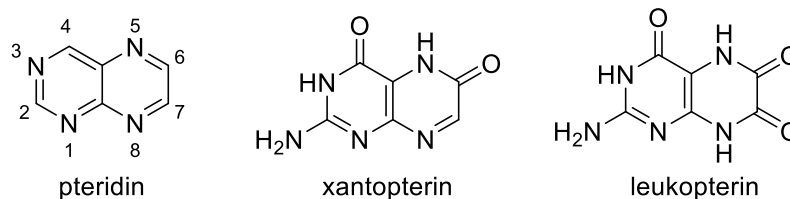
Využití selektivních CDK4/6 inhibitorů pro léčbu rakoviny prsu se ukázalo jako účinné řešení se zvládnutelnými negativními efekty, ovšem rezistence, která se vůči těmto inhibitorům postupně zvyšuje, se nedá přehlížet. CDK6 je častěji spojován s rezistencí vůči CDK4/6 inhibitorům než CDK4. Protože zvýšená aktivita CDK6 vyvolává rezistenci, její selektivní inhibice by jí předešla (Li et al., 2018). V posledních letech byly zkoumány mechanismy vzniku *de novo* či získané rezistence v preklinických a translačních studiích. Bylo zjištěno, že existují minimálně dva mechanismy vzniku rezistence. Jedním z nich jsou abnormality v buněčném cyklu způsobené ztrátou funkce či mutací pRb, amplifikací CDK6 a zvýšenou expresí cyklinu E1. Dalším je například

hyperaktivace signální dráhy fosfatidylinositol 3 - kinasa (PI3K, EC 2.7.1.137) / protein kinasa B (AKT1, EC 2.7.11.1) / mTOR (savčí cíl rapamycinu) (O'Leary et al., 2016; Pandey et al., 2019).

Signální dráha PI3K/AKT1/mTOR reguluje široké spektrum buněčných mechanismů, jako je přežití buňky, proliferace, růst, metabolismus a angiogenezi. Tato dráha je při hyperaktivaci přítomna v mnoha typech rakovinových buněk (Manning & Cantley, 2007). Podle některých studií se ukázalo, že PI3K dráha je hyperaktivována v buňkách rezistentních vůči CDK4/6 inhibitorům. Proto bylo navrženo, že kombinací CDK4/6 inhibitorů s inhibicí PI3K/AKT1/mTOR signální dráhy by se mohlo při léčbě předejít rezistenci (Herrera-Abreu et al., 2016). V klinických studiích byl společně s léčivem palbociclib testován mTOR inhibitor vistusertib (AZD2014), který při použití snižoval hladinu cyklinu D1, což vedlo k hypofosforylaci pRb a tím regulaci transkripce zprostředkované E2F faktorem. Ovšem tato kombinace nevedla k úplnému zastavení nárůstu rakoviny, pouze k prodlouženému klidovému stavu (Michaloglou et al., 2018). Kromě toho byla provedena preklinická studie kombinace palbociclibu s mTOR inhibitorem sapanisertib, jejichž kombinace synergicky inhibovala proliferaci rakoviny prsu (Yamamoto et al., 2019). U výzkumu léčby rakoviny prsu se ukázalo, že vyvinuté CDK4/6 inhibitory a také PI3K/AKT1/mTOR inhibitory zvyšují přežití bez progresu (PFS) i celkové přežití (OS), avšak CDK4/6 inhibitory jsou výrazně lepší z hlediska přežití bez progresu (Xu et al., 2022).

### 2.3 Molekuly s pteridinovým skeletem

Pteridin (Obr. 6) je heterocyklická molekula vzniklá spojením pyrimidinového a pyrazinového kruhu. Výzkum této organické látky začal izolací pigmentů z motýlích křídel Frederickem Gowlandem Hopkinsem v roce 1889 (Pfleiderer, 1992). Později v letech 1924–1926 byly tyto pigmenty dále purifikovány v laboratoři Heinricha Wielanda a byly pojmenovány xantopterin a leukopterin (Obr. 6). Pro tyto motýlí pigmenty byl obecně zvolen název pteridiny, zatímco název pterin byl používán jako obecný pojem všech hmyzích pigmentů. V dnešní době je jako pteridin podle IUPAC brán pyrazino[2,3-*d*]pyrimidin a jako pteriny jsou nazývány přírodní pteridiny, přitom se jedná o deriváty 2-aminopterin-4(3*H*)-onu (Carmona-Martínez et al., 2019; Rembold & Gyure, 1972).



Obr. 6: Struktura pteridinu a přírodních derivátů xantopterinu a leukopterinu.

Všechny přírodní pteriny jsou u prokaryotických i eukaryotických organismů tvořeny z guanosintrifosfátu (GTP). Tyto látky nemusí být pouze přírodními pigmenty. Byly objeveny přírodní pteriny, které mají nezbytnou metabolickou roli jako enzymatické kofaktory a jsou také zapojeny do syntézy nukleových kyselin, aminokyselin a neurotransmiterů. Rozmanité biologické funkce molekul s pteridinovým skeletem vedly k syntéze mnoha různých derivátů s cílem studie jejich možného uplatnění v terapii. Nejvíce studovaná je jejich protinádorová aktivita, ale jsou také slibné v oblasti léčby chronických zánětlivých onemocnění a možné je i jejich využití při léčbě jiných nemocí, jako je diabetes, osteoporóza nebo ischemie (Carmona-Martínez et al., 2019).

### 2.3.1 Syntéza pteridinového skeletu

Nejběžnější způsob zisku pteridinového skeletu je Gabriel-Isay kondenzační reakce, při které reaguje 5,6-diaminopyridin s 1,2-dikarbonylovou sloučeninou. Oskar Isay touto reakcí připravil 6,7-difenylpteridin již na začátku 20. století a této metodě podobné kondenzační reakce jsou využívány dodnes (Pfleiderer, 1984).

Syntéza využívající symetrické dikarbonylové sloučeniny nepředstavuje žádný problém z hlediska regioselektivity, avšak použití asymetrických dikarbonylových sloučenin pro přípravu substituovaných pteridinů v poloze 6 může vést ke vzniku směsi produktů (Taghavi-Moghadam & Pfleiderer, 1997). Tento problém lze vyřešit převedením karbonylové sloučeniny na příslušný oxim **2** a následnou kondenzací pro získání substituovaného pteridinu **3** (Schéma 1). Tato metoda byla již dříve využita při syntéze inhibitorů NO-syntasy (NOS, EC 1.14.13.39), která katalyzuje oxidaci *L*-argininu na oxid dusnatý a *L*-citrulin (Fröhlich et al., 1999; Suckling et al., 2008).



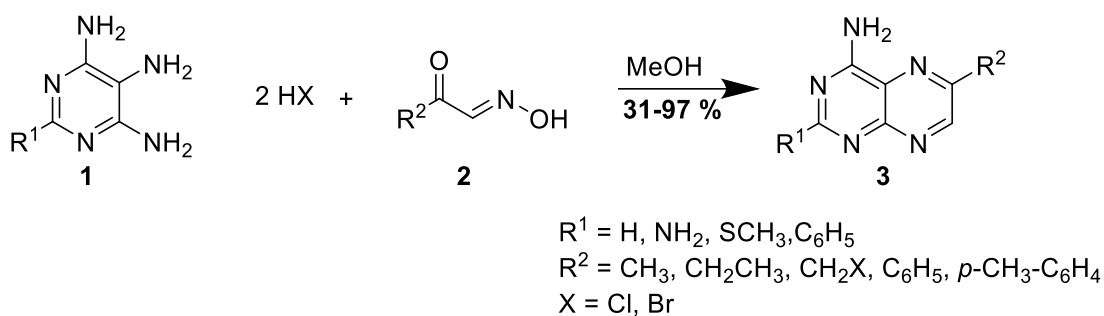


Schéma 1: Příprava pteridinových derivátů s využitím oximů. Převzato od Suckling et al., 2008.

Pro svou rozmanitou biologickou aktivitu byly a jsou dodnes připravovány různé substituované deriváty 5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **5**. Tyto deriváty se běžně syntetizují cyklizačními reakcemi s kyselinou šťavelovou nebo jejími deriváty. Pro přípravu samotného 5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **5** použili Ohmori et al. (1996) 4,5-diaminopyridin **4** a kyselinu šťavelovou v 4M HCl (Schéma 2) a tato látka byla poté testována jako inhibitor AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-propionát) receptoru s potencionálním využitím pro terapii neurodegenerativních onemocnění.

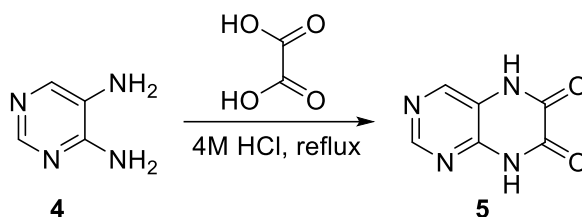


Schéma 2: Příprava 5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **5**.

Další substituované deriváty látky **5** připravili Breault et al. (2008) jako potenciální inhibitory bakteriálního enzymu glutamátacemasy (Murl, EC 5.1.1.3), při jejichž syntéze vycházeli z 2-thio-4,6-diamino-pyridinu **6** (Schéma 3). Tento derivát nechali reagovat s různými alkylbromidy, čímž získali deriváty **7a-d**, ze kterých následně nitrosací s dusitanem draselným ve vodě a následnou katalytickou hydrogenací s PtO<sub>2</sub> připravili triamino deriváty **9a-d** pro cyklizační reakci. Pro cyklizaci použili ethyl 2-chlor-2-oxoacetát v *N*-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) a připravili tím 5,8-dihydropteridin-6,7-

dionové deriváty substituované v poloze 2 (**10a-d**), ze kterých reakcí s benzylbromidem získali testované látky **11a-d** (Obr. 7).

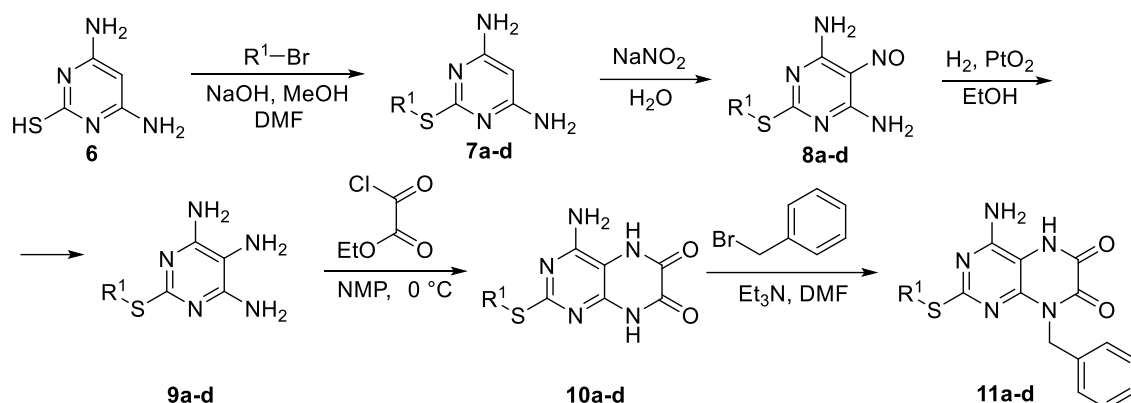
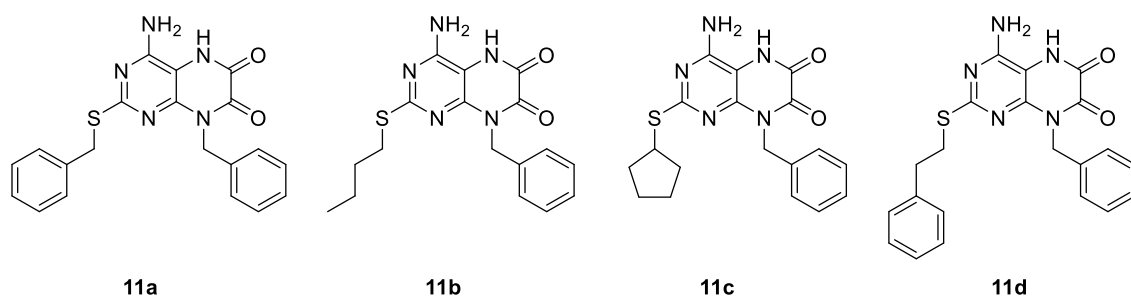


Schéma 3: Příprava substituovaných derivátů látky **5**. Převzato od Breault et al., 2008.



Obr. 7: Připravené deriváty látky **5** substituované v poloze 2.

Pro přípravu dalších derivátů využili látku **10b**, kterou dále substituovali v poloze 8 s příslušnými alkylbromidy, čímž získali deriváty **12a-e** (Schéma 4), jejichž struktury jsou uvedeny na Obr. 8.

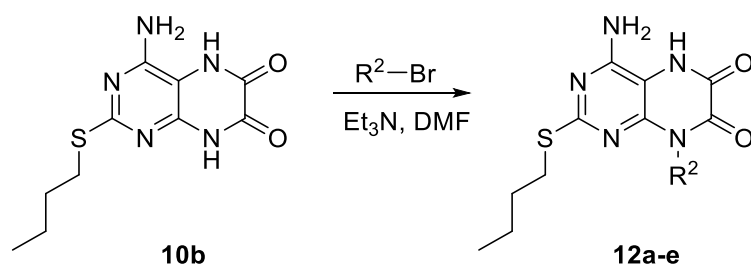
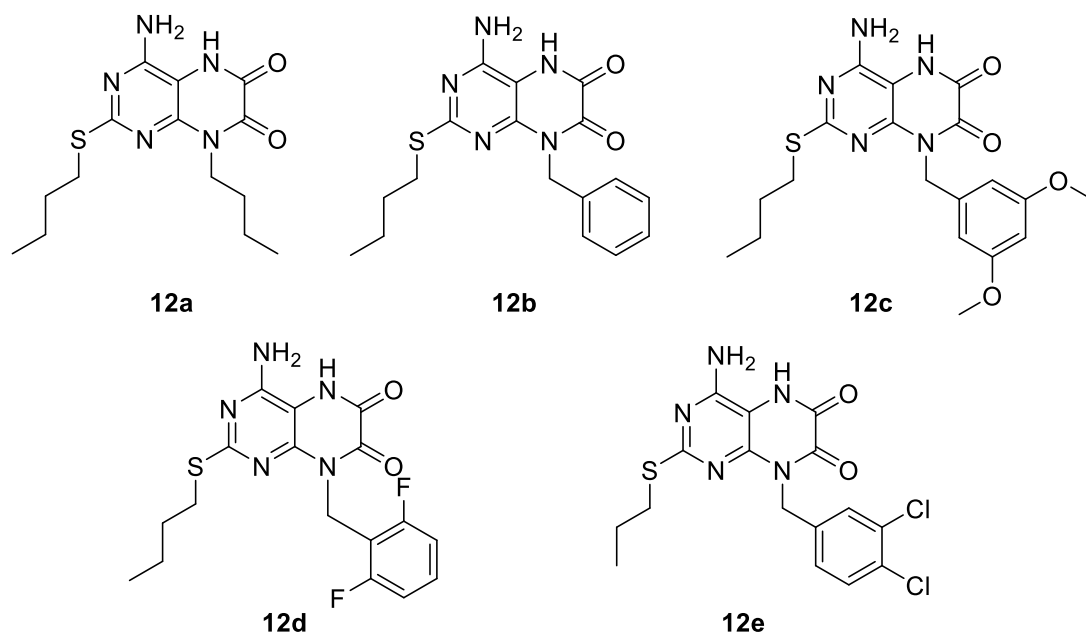


Schéma 4: Příprava derivátů **10b** substituovaných v poloze 8.



Obr. 8: Připravené deriváty látky **10b** substituované v poloze 8.

Pro možné antiproliferativní účinky také nasyntetizovali Geng et al. (2018) deriváty 5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **5**, které byly následně testovány proti rakovině žaludku, plic a prostaty na vybraných buněčných liniích (Schéma 5). Pro přípravu klíčových intermediátů **16a-d** byl opět použit ethyl 2-chlor-2-oxoacetát v acetonu za přítomnosti  $K_2CO_3$ , po které následovala reakce v kyselině octové pro uzavření cyklu a vytvoření pteridinového kruhu.

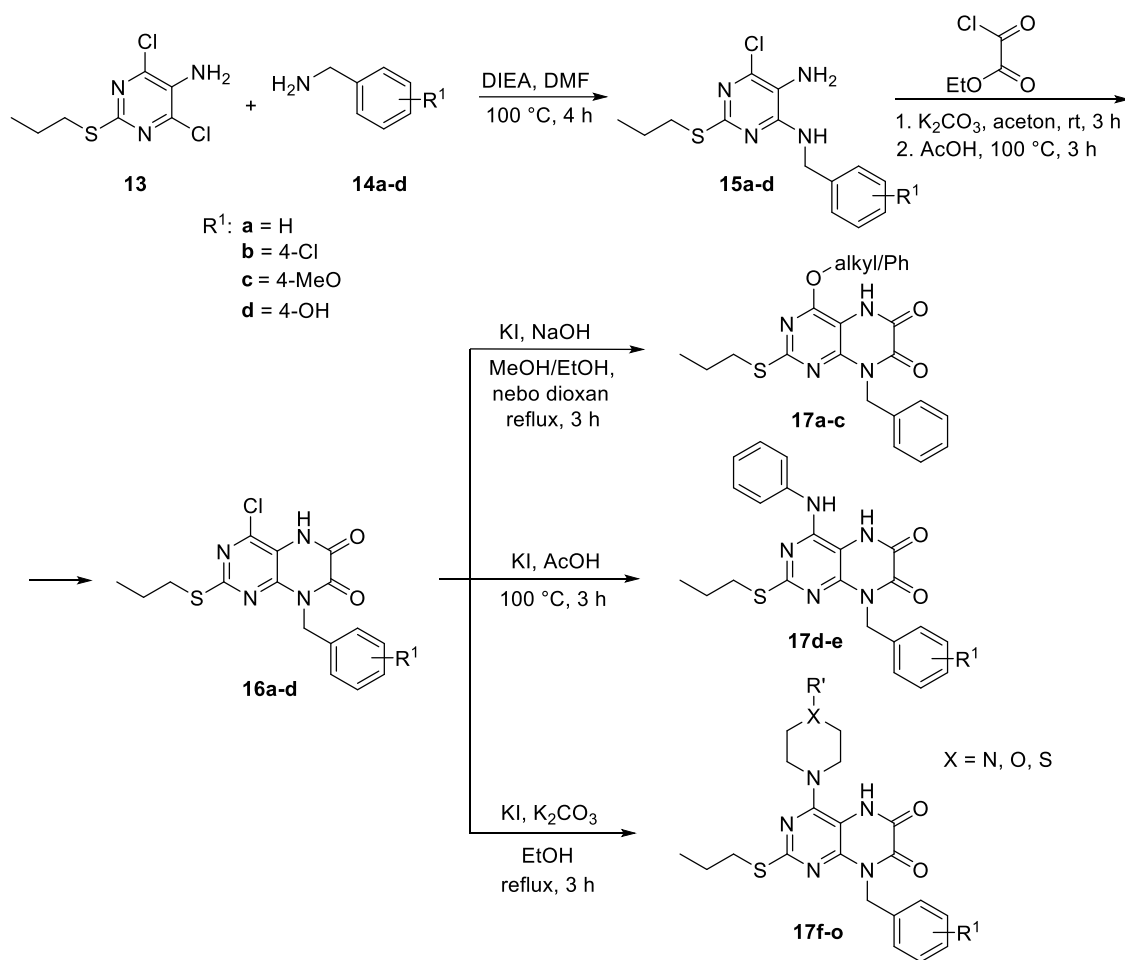


Schéma 5: Znázornění syntézy derivátů 5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **5** s antiproliferačními účinky. Převzato od Geng et al., 2018.

## 2.4 Molekulový docking

Molekulový docking je metoda, při které se analyzuje konformace a orientace molekul ve vazebném místě makromolekulárních látek (Torres et al., 2019). Tato metoda se běžně používá ve výpočetní chemii a je často využívána při výzkumu nových léčiv (Novikov & Chilov, 2009).

Molekulový docking typicky zahrnuje dva související úkoly: nalezení možných konformačních stavů komplexu protein-ligand a výpočet volné energie takových komplexů nebo vytvoření skóre, které koreluje např. s biologickou aktivitou. Vzorkovací algoritmus vyhledá konformaci, při které je vazebná energie proteinu a ligandu na globálním minimu (Novikov & Chilov, 2009).

Nejstarší metody dockingu byly založeny na předpokladu modelu „zámek a klíč“, podle kterého jsou ligand a receptor rigidní tělesa a jejich afinita je přímo úměrná jejich geometrické shodě. Pozdější teorie indukovaného přizpůsobení navrhovala, že by se s ligandem a receptorem mělo během dockingu zacházet jako s flexibilními tělesy. Tyto

dokovací algoritmy s flexibilními tělesy nejen přesněji předpovídají způsob vazby molekul než algoritmy s rigidními tělesy, ale také přesněji předpovídají afinitu vůči jiným sloučeninám (Koshland, 1963; Pagadala et al., 2017).

Prvním krokem pro provedení dokovacích výpočtů je získání struktury cílové látky, což většinou bývá makromolekulární látka (protein, DNA nebo RNA). Struktury těchto makromolekul mohou být získány přímo z Protein Data Bank (PDB), která poskytuje přístup k trojrozměrným strukturám makromolekul. Za posledních dvacet let bylo vyvinuto několik dokovacích programů, jako je např. AutoDock, AutoDock Vina (Scripps Research Institute), DockThor (LNCC/MCTI), GOLD (CCDC Cambridge), FlexX (BiosolveIT, Germany) a Molegro Virtual Docker (Molexus) (Torres et al., 2019). Skoro všechny dokovací programy, kromě programu GOLD, pracují s receptorem jako s rigidním tělesem a s ligandem jako flexibilním (Pagadala et al., 2017).

Docking se často využívá k otestování proveditelnosti jakékoliv biochemické reakce ještě před jejím experimentálním provedením. V některých oblastech může dokování hrát důležitou roli. Například studie interakcí mezi malými molekulami (ligandy) a cílovými proteiny (enzymy) mohou předpovědět, jakým způsobem se enzym aktivuje, nebo jakým způsobem se ligand dokáže navázat k nukleovým kyselinám. Tyto informace pak dávají do souvislosti strukturu molekul s jejich cytotoxicitou. Medicinální chemici využívají tyto *in silico* metody, aby předpověděli, zda vyvíjená molekula interaguje s proteiny/DNA. Pokud je dokovacím programem předpovězena taková interakce, pak se tato interakce otestuje experimentálně pro zjištění opravdových vazebných interakcí. Tímto způsobem je zjištěno, jak se mají testované molekuly modifikovat, aby došlo k jejich specifickému navázání na cílenou sekvenci/strukturu (Dar & Mir, 2017).

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následující části bude diskutována syntéza nových dihydropteridinových derivátů modifikovaných v poloze 2, molekulový docking navržených derivátů a také biologická aktivita připravených látek.

#### 3.1 Design cílových látek a návrh syntézy

Jak bylo již zmíněno v kapitole 2.2.1, bylo navrženo, že selektivní CDK4/6 inhibitory by měly mít pět strukturních vlastností, které byly určeny podle molekulového dockingu palbociclibu.

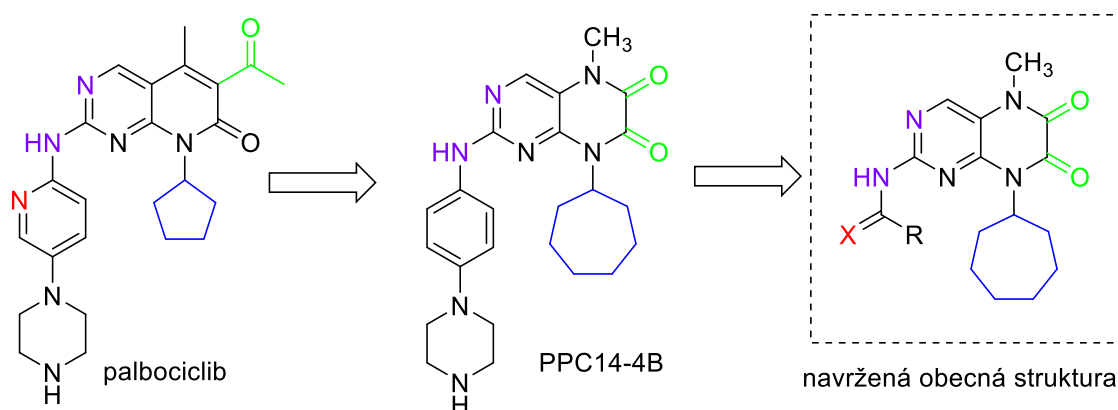


Schéma 6: Design finálních derivátů podle strukturních požadavků odvozených od molekulového dockingu palbociclibu a již připravené látky PPC14-4B.

V předchozím výzkumu na katedře organické chemie ve skupině doc. Petra Cankaře, Ph.D. byla připravena skupina pteridinových derivátů, které vychází z tohoto modelu. Deriváty obsahovaly různé substituenty v poloze 8. Doposud však nebyla obměněna pozice 2, a tudíž takovéto látky nebyly testovány na biologickou aktivitu. Pro tuto práci byla navržena obecná struktura, která obsahuje heteroatom X, který simuluje dusíkový atom nacházející se v pyridinovém kruhu molekuly palbociclibu, a který stojí za jeho významnou biologickou aktivitou (Schéma 6). Takový strukturní motiv obsahující právě heteroatom X by mohl být amid karboxylové kyseliny, derivát močoviny nebo by to mohl být heteroatom, který je součástí aromatického kruhu stejně jako v molekule palbociclibu. Poloha 2 bude obměňována na skeletu, který vychází ze struktury již připravené látky PPC14-4B, která měla z připravených látek nejlepší aktivitu na CDK4.

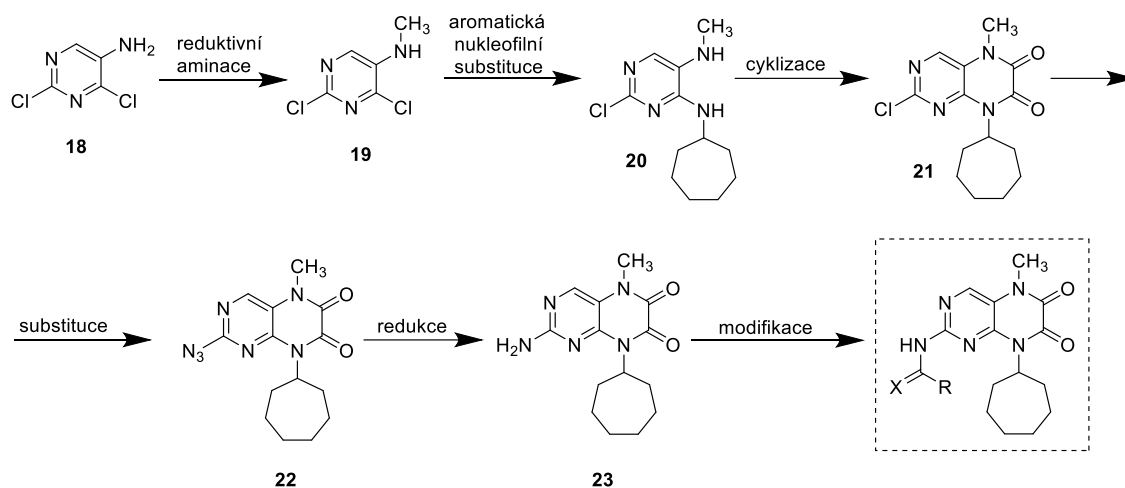


Schéma 7

Syntéza vedoucí k přípravě těchto látek byla navržena tak, že se v několika krocích připraví amin **23**, který bude dále modifikován na již zmíněné finální deriváty.

Příprava výše zmíněného aminu **23** vychází z komerčně dostupného 2,4-dichloropyrimidin-5-aminu **18**. Navržená syntéza je pěti kroková (Schéma 7), kdy první tři kroky vedou k přípravě chloridu **21** podle postupu z literatury (Tomanová et al., 2022). Prvním krokem je zavedení methylu na aminoskupinu komerčního pyrimidinu **18**, dále následuje selektivní substituce jednoho atomu chlóru pyrimidinu cykloheptylaminem za vzniku látky **19**, která bude podrobena cyklizaci za vzniku dihydropteridinu **21**. Derivát **21** pak převeden na cílový intermediát **23** přes azid **22**.

### 3.2 Příprava intermediátu **23**

Jak již bylo zmíněno, prvním reakčním krokem je modifikace amino skupiny látky **18** methylovou skupinou. Této přeměny bylo dosaženo reduktivní aminací pomocí 37 % vodného roztoku formaldehydu. Reakce probíhala v methanolu (MeOH) v prostředí kyseliny octové. Imin byl redukován pomocí  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Methylovaný produkt **19** byl získán ve výtěžku 70 % (Schéma 8).

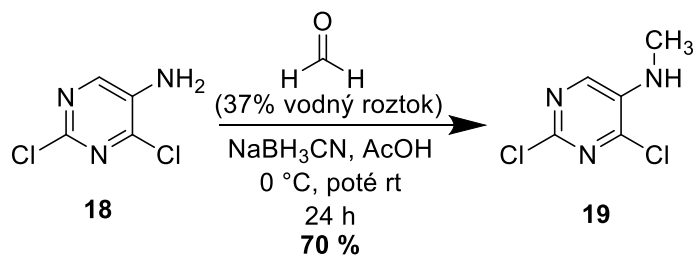


Schéma 8

Dalším krokem byla aromatická nukleofilní substituce s cykloheptylamínem. Reakce probíhala v dimethylsulfoxidu (DMSO) za přítomnosti báze *N,N*-diisopropylethylaminu (DIEA) při 85 °C po dobu 7 dnů (Schéma 9). Po izolaci pomocí extrakce do ethylacetátu (EtOAc) a sloupcové chromatografie byl produkt získán ve výtěžku 78 %.

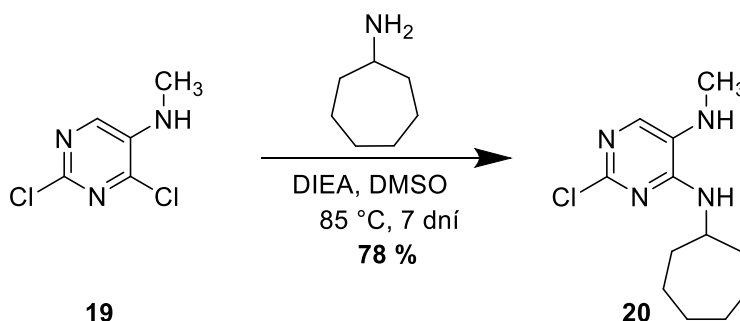


Schéma 9

Pro tvorbu dihydropteridinového skeletu (Schéma 10) byl k 2-chlor-*N*<sup>4</sup>-cykloheptyl-*N*<sup>5</sup>-methylpyrimidin-4,5-diaminu **20** rozpuštěném v suchém THF přidán za stálého chlazení oxalylchlorid a poté pomalu po kapkách silná báze bis(trimethylsilyl)amid lithný (LiHMDS), čímž došlo k cyklizaci a vytvoření dihydropteridinového skeletu. Po 2 hodinách byla podle TLC reakce ukončena. Rozpouštědlo ze směsi bylo odpařeno na RVO a produkt získán po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan:EtOAc (1:1). Produkt **21** byl získán ve výtěžku 69 %.

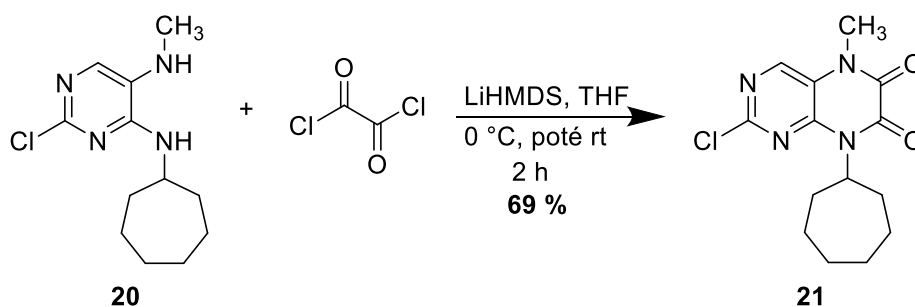


Schéma 10

Po cyklizaci byla snaha o přípravu azidu **22** nejjednodušší cestou, a to přímou substitucí s azidem sodným (Schéma 11). Bohužel ani v jednom ze dvou pokusů nedošlo podle TLC ke konverzi a zisku chtěného produktu (Tab. 1).



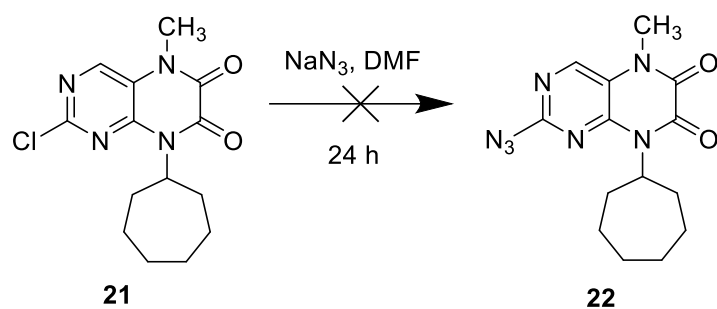


Schéma 11

Tab. 1: Reakční podmínky při přípravě azidu **22**.

#	NaN <sub>3</sub>	Báze	Rozpouštědlo	T [°C]	Výtěžek
1	10 ekv.	–	DMF	80	–
2	1,2 ekv.	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	80	–

Pro přípravu azidu byla proto zvolena jiná strategie. Inspirací byla práce podle Steklova et al. (2011). Azid **22** byl připraven ve dvou krocích. V prvním kroku byl substituční reakcí s N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O v rozpouštědle ethanol (EtOH) připraven hydrazin **24** ve formě žluté sraženiny, která byla odfiltrována a promyta. Následně reakcí hydrazinu **24** s dusitanem sodným v prostředí 10% AcOH a 1M HCl po dobu 24 hodin byl získán azid **22** ve formě hnědé sraženiny, která byla zfiltrována a promyta vodou (Schéma 12).

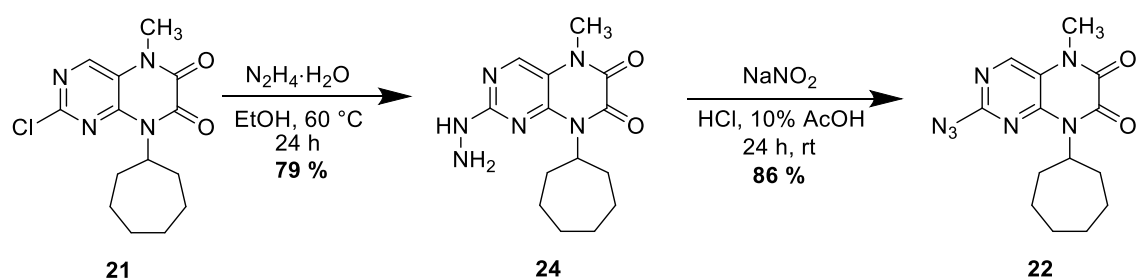


Schéma 12

Pro redukci azidu **22** na amin **23** byla navržena Staudingerova reakce, která probíhá ve dvou krocích. Reakcí azidu **22** s trifenylofosfinem v rozpouštědle dichlormethan (DCM) byl připraven fosfinimin **25**, který se podařilo izolovat. Problém avšak nastal při pokusu o jeho hydrolyzu, při které sice docházelo ke vzniku aminu **23**, ale nepodařilo se jej izolovat (Schéma 13).

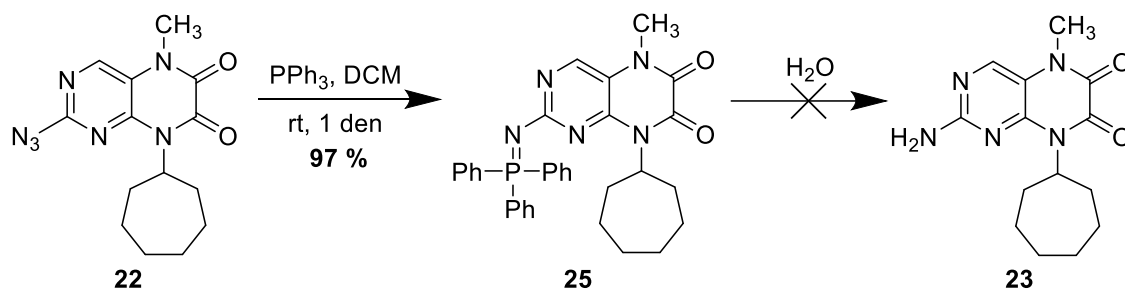


Schéma 13

Jednodušším řešením oproti Staudingerově reakci pro získání azidu **22** byla nakonec přímá redukce katalytickou hydrogenací s 10% palládiem na aktivním uhlí jako katalyzátorem v EtOAc jako rozpouštědlem (Schéma 14). Po ukončení reakce byl produkt přefiltrován přes křemelinu a odpařen, čímž byl získán amin **23** ve formě pevné bílé látky. Tato reakce byla převzata od Shortnacy-Fowler et al. (2001).

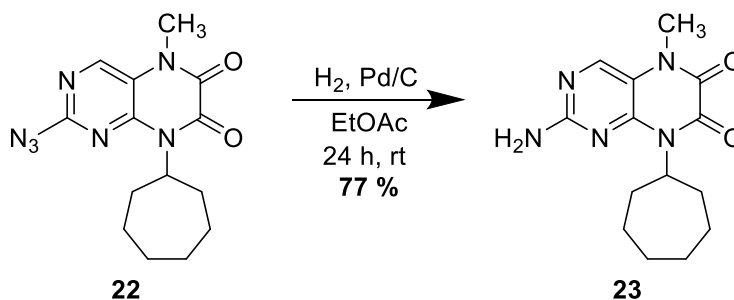


Schéma 14

### 3.3 Využití aminoderivátu **23** pro syntézu finálních látek

#### 3.3.1 Příprava amidů kyselin a močovinových derivátů

Po přípravě aminu **23** byla na řadě příprava daných amidů, jako finální produkty. Pro ověření reaktivity připraveného aminu **23** byla vyzkoušena testovací reakce s fenylctovou kyselinou za podmínek amidového couplingu (Schéma 15). Bylo vyzkoušeno pět reakčních podmínek (Tab. 2), avšak ani v jednom případě nedošlo podle TLC k reakci, zřejmě kvůli snížené reaktivitě aminoskupiny v poloze 2, která sousedí s dvěma dalšími atomy dusíku na aromatickém jádře.

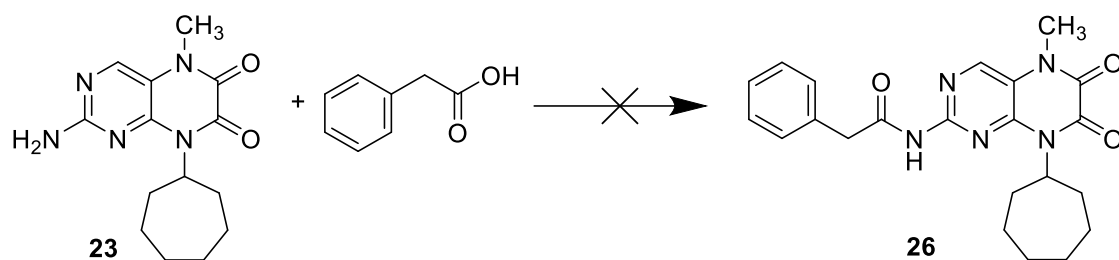


Schéma 15

Tab. 2: Reakční podmínky pro přípravu amidu **26**.

#	Amin <b>23</b>	Fenylactová kyselina	Činidlo	Báze	Rozpouštědlo	T [°C]	Čas [h]	Výtěžek
1	1 ekv.	1 ekv.	DCC (1 ekv.)	–	DCM	rt	24	–
2	1 ekv.	1 ekv.	HOBt (1 ekv.), EDCI (2 ekv.)	TEA (1,2 ekv.)	DCM	0	24	–
3	1 ekv.	2 ekv.	HBTU (2 ekv.)	DIEA (4 ekv.)	DMF	rt	24	–
4	1,2 ekv.	1 ekv.	T3P (1,5 ekv.)	Pyridin (2 ekv.)	EtOAc	0	24	–
5	1,2 ekv.	1 ekv.	T3P (2,5 ekv.)	DIEA (4 ekv.)	EtOAc	40	24	–

Z důvodu nízké reaktivity byla otestována tvorba amidu s benzoylchloridem, který je velmi reaktivní (Schéma 16). Testováno bylo použití báze triethylaminu (TEA) a reakce byla prováděna v DCM nebo byla reakce provedena v pyridinu, a to za pokojové a zvýšené teploty 100 °C. Avšak opět podle TLC nebyl detekován žádný produkt (Tab. 3).

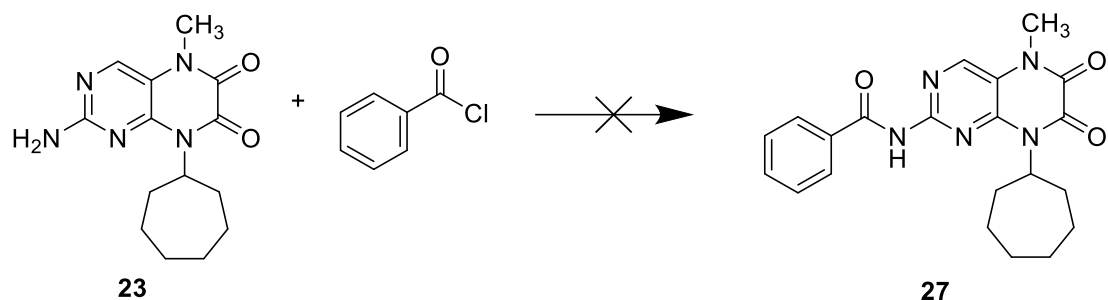


Schéma 16

Tab. 3: Reakční podmínky při reakci aminu **23** s 1,2 ekvivalenty benzoylchloridu.

#	Báze	Rozpouštědlo	T [°C]	Čas [h]	Výtěžek
1	TEA (3 ekv.)	DCM	rt	24 h	–
2	–	Pyridin	rt	24 h	–
3	–	Pyridin	100	24 h	–

Nabízela se tedy další možnost přípravy amidů, a to oxidací iminů, který by měl jít připravit z fosfiniminu **25**, který byl připraven pro přípravu aminu **23** Staudingerovou reakcí (viz. kapitola 3.2). Připravený fosfinimin **25** byl využit v reakci s benzaldehydem, čímž bychom získali imin **28** (Schéma 17), který by po oxidaci poskytl amid. Podle TLC však v žádném případě nedocházelo k reakci a tvorbě produktu (Tab. 4).

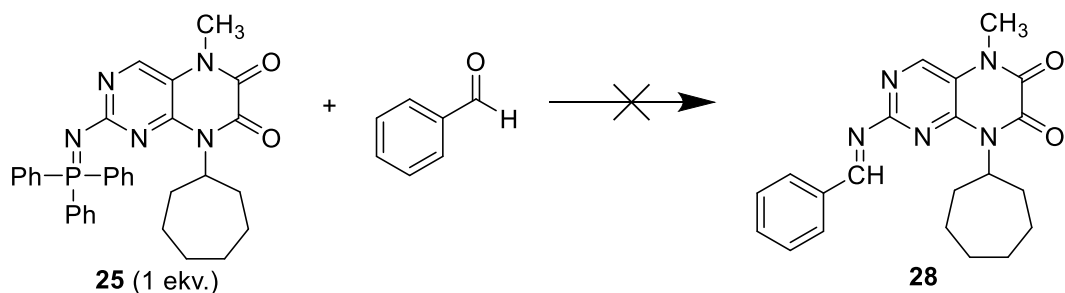


Schéma 17

Tab. 4: Reakční podmínky při přípravě iminu **28**.

#	Benzaldehyd	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas [h]	Výtěžek
1	2 ekv.	CHCl <sub>3</sub>	rt	24	–
2	2 ekv.	Toluen	110	24	–
3	10 ekv.	Toluen	100	24	–
4	40 ekv.	–	100	24 h	–

Obdobně byla také testována reakce fosfiniminu **25** s fenylisokyanátem, která vede k přípravě karbodiimidu **29** (Schéma 18). Karbodiimid **29** by po následné hydrolyze poskytoval močovinový derivát. Tato reakce byla testována za podmínek uvedených v tabulce 5. Ani v tomto případě však podle TLC nedošlo ke vzniku produktu.

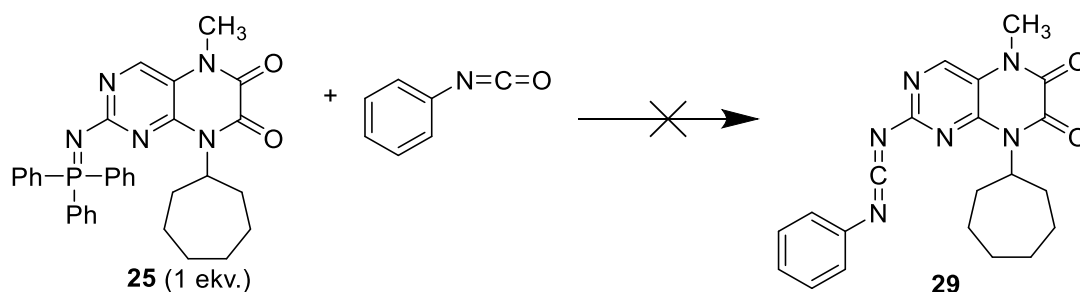


Schéma 18

Tab. 5: Reakční podmínky při přípravě karbodiimidu **29**.

#	Fenylisokyanát	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Čas [h]	Výtěžek
1	2 ekv.	Toluen	110	24 h	–
2	10 ekv.	Toluen	100	24 h	–
3	2 ekv.	CHCl <sub>3</sub>	rt	24 h	–

### 3.3.2 Coupling s aminem **23**

Po neúspěšných pokusech o tvorbu amidů a močovinových derivátů jsme se pokusili na aminoskupinu látky **23** navázat aryl za podmínek Buchwald-Hartwigovy reakce. Prvním pokusem byla reakce s pyrrolopyridinem **30**, který byl před reakcí ochráněn Boc protektivní skupinou. Při couplingové reakci byl využit octan palladnatý jako katalyzátor, ligand 1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen (*dppf*) a jako báze byl použit fosforečnan draselný. Reakce byla provedena v 1,4-dioxanu za zvýšené teploty (Schéma 19). Podle HPLC však nedocházelo ke vzniku produktu.

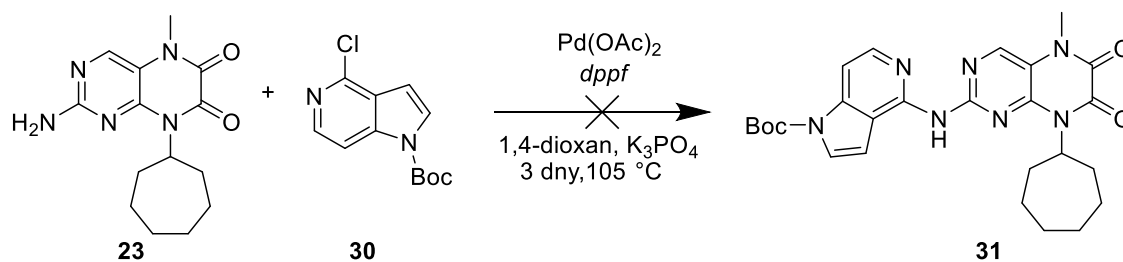


Schéma 19

Stejným postupem byl ponechán reagovat amin **23** s dihydronaftyridinem **32**, který byl opět opatřen chránicí skupinou Boc před reakcí. Reakce však stejně jako v předchozím případě nevedla ke vzniku produktu (Schéma 20).

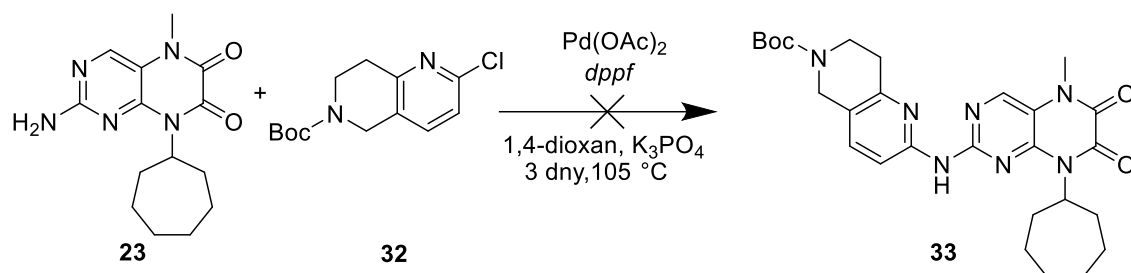
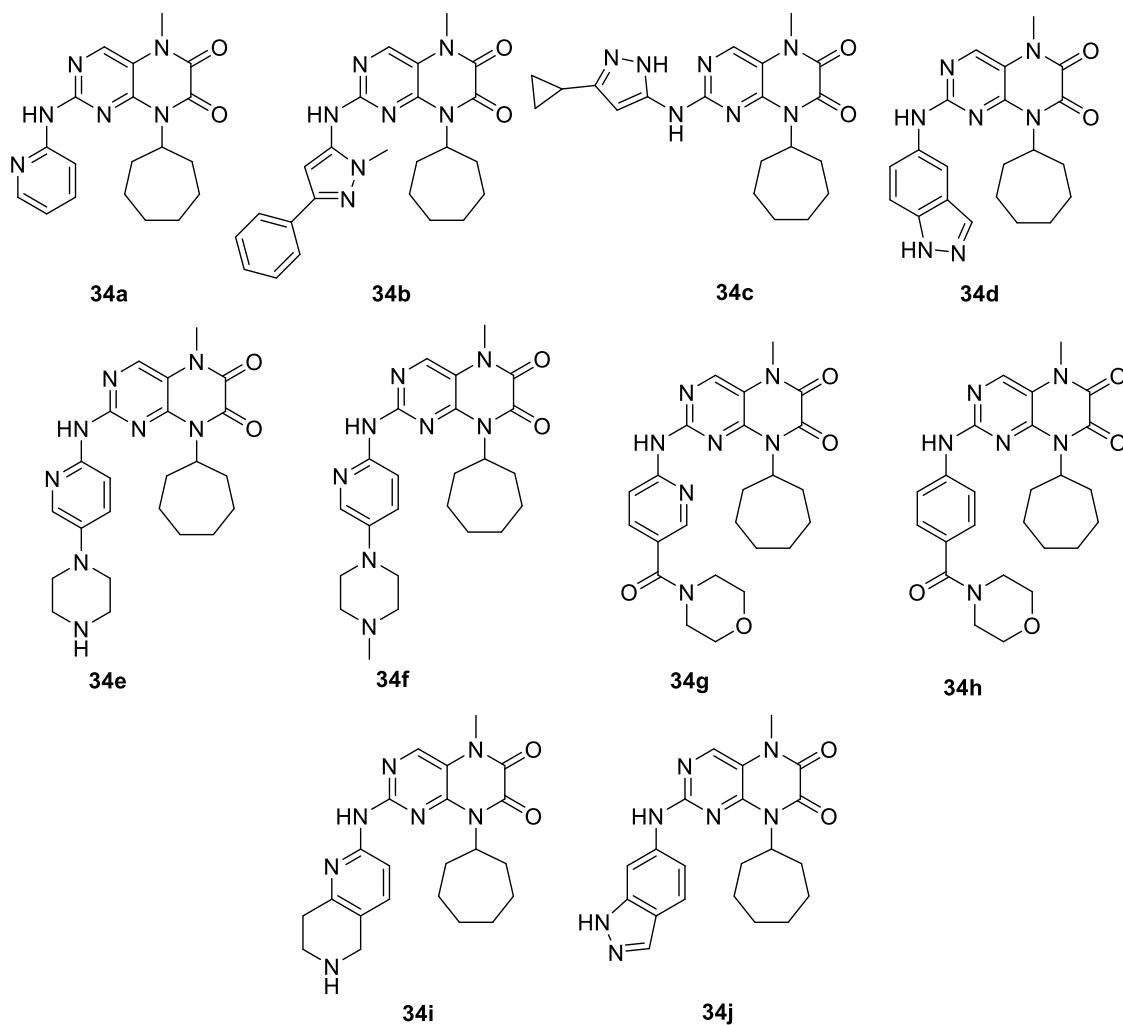


Schéma 20

### 3.4 Příprava finálních derivátů

Protože ani v jednom případě reakce pro tvorbu amidu nefungovaly a amin **23** se nedal využít ani pro couplingové reakce, rozhodli jsme se tuto syntetickou cestu opustit. Nabízelo se využití již připraveného chloridu **21**, který by mohl být substituován různými aminy, a to za podmínek aromatické nukleofilní substituce nebo Buchwald-Hartwigovy reakce. Byla navržena skupina látek (Obr. 9) a u těchto navržených derivátů byl také proveden molekulový docking, jehož výsledky jsou uvedeny níže (viz. kapitola 3.5).



Obr. 9: Navržené struktury cílových látek.

Prvním pokusem o přípravu finálních derivátů byla přímá substituční reakce s aminy. Pro tyto reakce byl použit příslušný amin v nadbytku a reakce probíhaly v *N,N*-dimethylformamidu (DMF) za zvýšené teploty. Všechny reakce byly monitorovány pomocí HPLC. Přímou aromatickou nukleofilní substitucí však ke vzniku chtěných produktů nedošlo u čtyř z pěti námi vybraných aminů (Schéma 21).

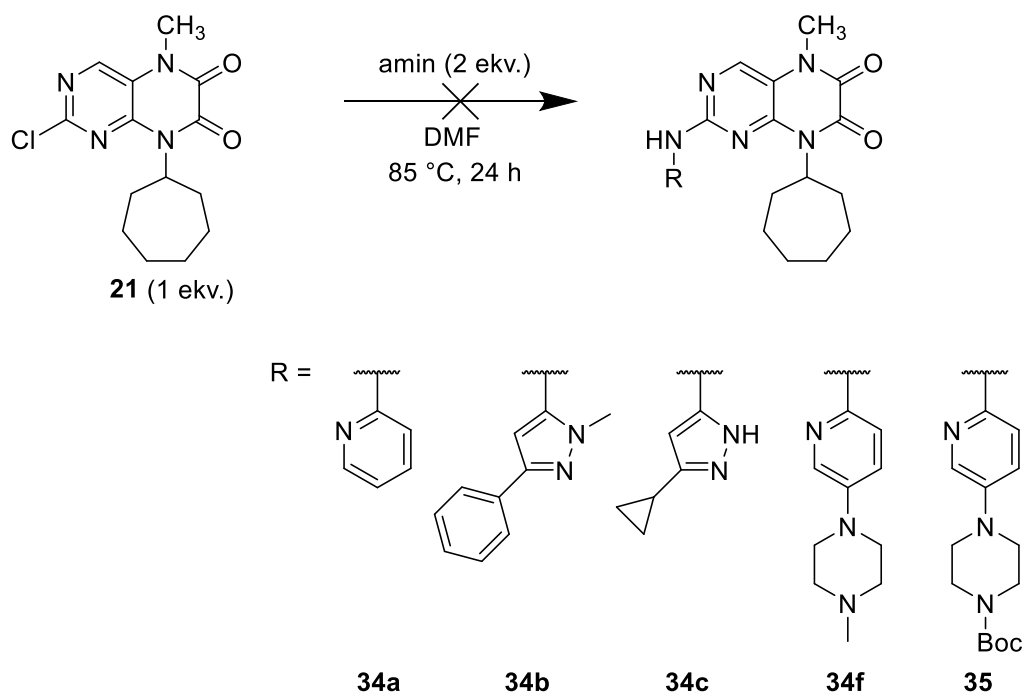


Schéma 21

Pouze u substituční reakce s aminem **36** se nám podařilo izolovat produkt s 42% výtěžkem. Z NMR analýzy se však ukázalo, že nedošlo ke vzniku chtěného produktu, ale došlo k demethylaci a k navázání přes dusíkový atom v piperazinovém kruhu (Schéma 22).

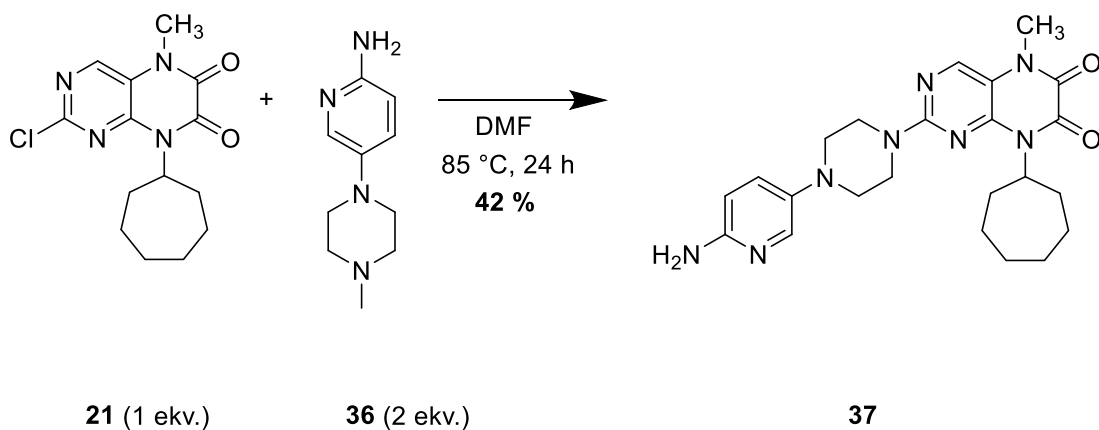


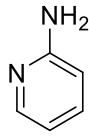
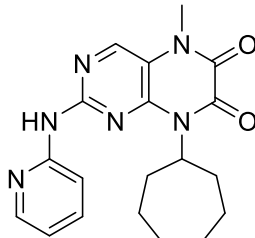
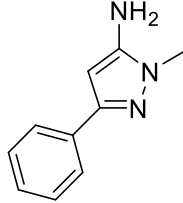
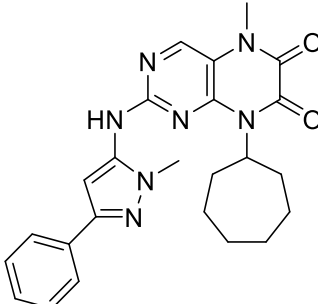
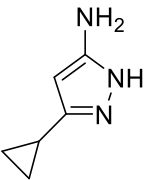
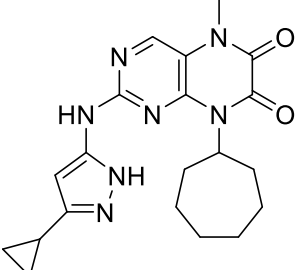
Schéma 22

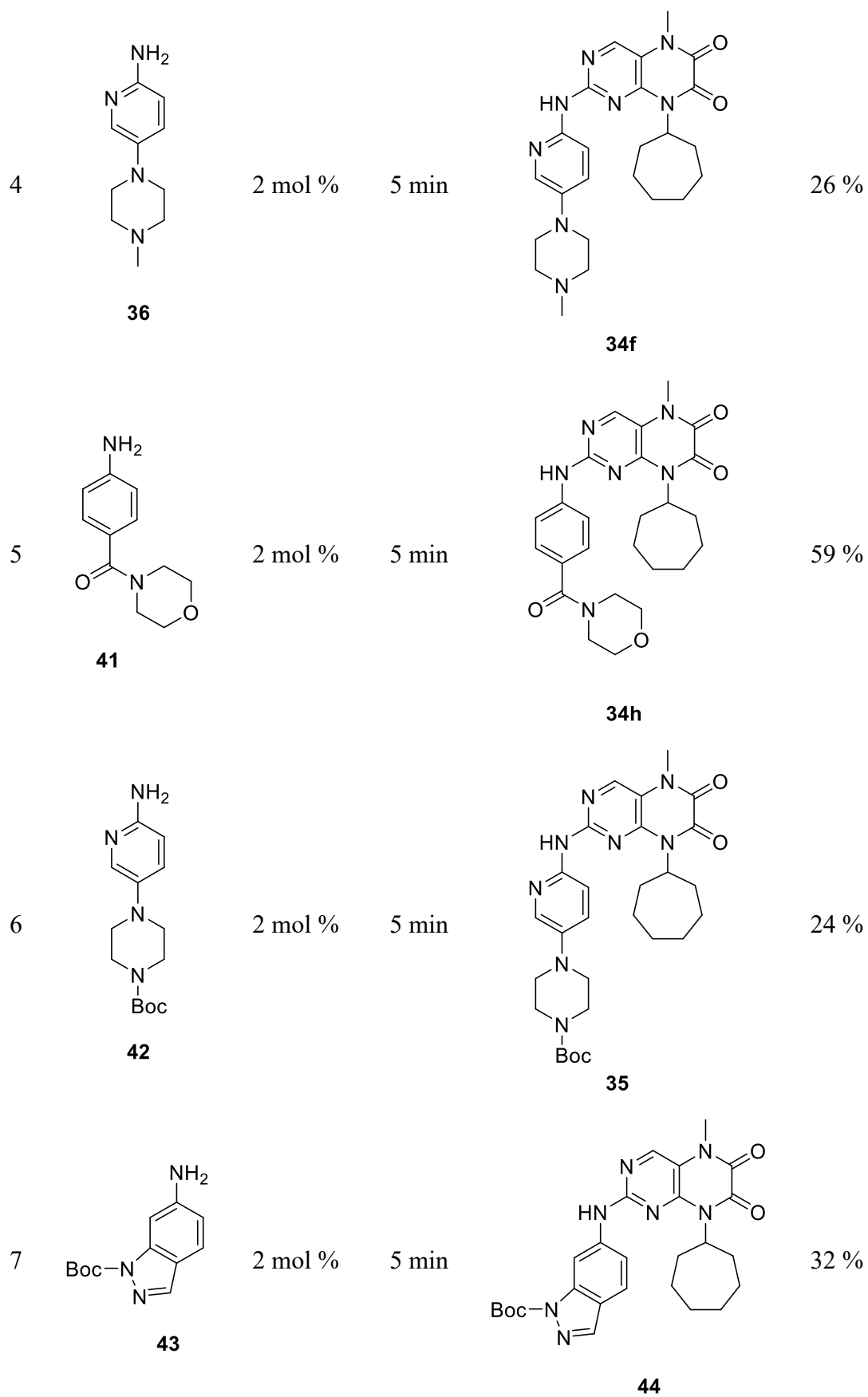
Jelikož se derivát **21** ukázal jako nereaktivní za podmínek aromatické nukleofilní substituce, byla tedy využita Buchwald-Hartwigova aminace. Reakce s aminy **36**, **38-43** byla testována v mikrovlnném reaktoru s prekatalyzátorem XPhos Pd G2 ve směsi rozpouštědel 1,4-dioxan/H<sub>2</sub>O (4:1). Jako první byla vyzkoušena reakce s aminem **38**, který byl ponechán reagovat v mikrovlnném reaktoru 1 hodinu. Podle HPLC se však



ukázalo, že docházelo k otevření cyklu a rozpadu dihydropteridinového skeletu u vytvořeného produktu, tak i částečně u výchozího chloridu **21**. Nabízela se tedy optimalizace reakčních časů, aby se ověřilo, zda k hydrolyze dochází až po vzniku produktu. Byl tedy testován kratší reakční čas 10 minut, který vedl ke vzniku produktu ve větším podílu, ale stále docházelo z velké části i k otevírání cyklu. Jako nejlepší se nakonec ukázal reakční čas 5 minut. Tímto způsobem se nám podařilo připravit deriváty **34b**, **34f**, **34h** a intermediáty chráněně Boc protektivní skupinou **35** a **44**. (Tab. 6). U derivátu **34c** se nám produkt nepodařilo izolovat ani po zkrácení reakčního času na 5 minut. Další reakce vedoucí k přípravě zbylých navržených derivátů nebyly z časových důvodů provedeny.

Tab. 6: Příprava finálních derivátů a intermediátů chráněných Boc protektivní skupinou.

#	Amin	XPhos Pd G2	Čas	Produkt	Výtěžek
1	 <b>38</b>	2 mol %	1 h	 <b>34a</b>	–
2	 <b>39</b>	2 mol %	5 min	 <b>34b</b>	29 %
3	 <b>40</b>	2 mol %	5 min	 <b>34c</b>	–



### 3.4.1 Deprotekce chráněných intermediátů **35** a **44**

Po přípravě intermediátů **35** a **44** byla provedena deprotekce Boc skupiny z aminu působením 35% HCl podle postupu z literatury (Tomanová et al., 2022). Intermediát **35** byl rozpuštěn ve směsi DCM/MeOH v poměru 1:1 a poté k němu byla po kapkách přidána 35% HCl (Schéma 20). Směs byla takto ponechána reagovat po dobu 2 dní. Po ukončení reakce byla směs neutralizována uhličitánem draselným rozpuštěným ve vodě, čímž zároveň došlo k vysrážení produktu. Po zfiltrování však bylo získáno pouze 15,9 mg produktu ve formě žluté pevné látky, což odpovídá výtěžku 49 %.

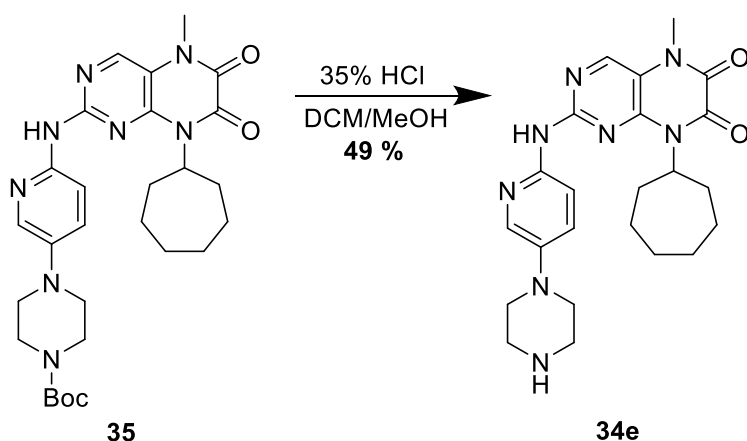


Schéma 23

Obdobná byla i deprotekce intermediátu **44** (Schéma 21), ovšem v tomto případě po reakci s 35% HCl a po následné neutralizaci s uhličitánem draselným rozpuštěným ve vodě nedošlo k vysrážení produktu. Místo toho byl produkt extrahován DCM a po odpaření přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází DCM:MeOH (30:1). Opět však bylo získáno pouze 7,4 mg žluté pevné látky s výtěžkem 40 %.

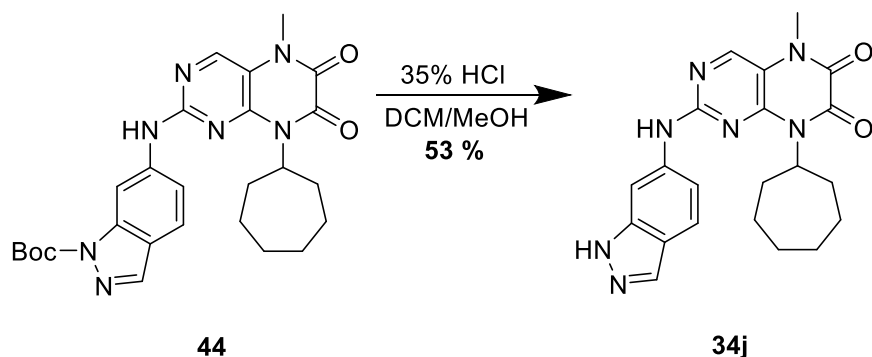


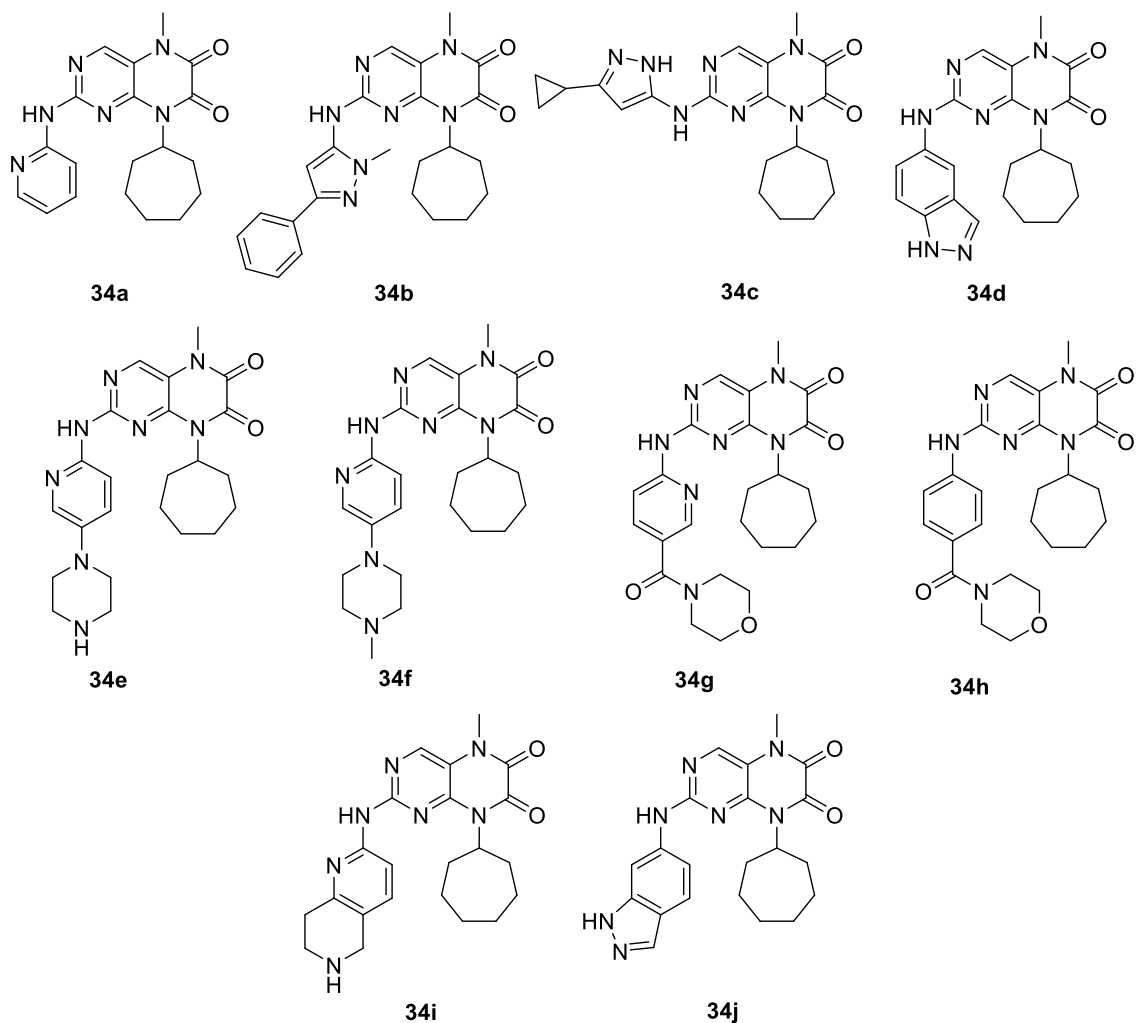
Schéma 24

### 3.5 Molekulový docking

S pomocí Mgr. Ing. Václava Bazgiera, Ph.D. z katedry fyzikální chemie byl s využitím dokovacího open-source programu AutoDock Vina proveden molekulový docking navržených finálních derivátů, pro přehlednost opět znázorněny níže (Obr. 10). Pro úpravu a práci se strukturami molekul byl využit vizualizační program Pymol. Molekulový docking navržených derivátů byl proveden celkem do šesti struktur, a to vždy do aktivní a neaktivní formy enzymu CDK2, CDK4 a CDK6. Po provedení dockingu byly získány hodnoty vazebné afinity v  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , pomocí kterých můžeme určit, jak silně se jednotlivé deriváty váží do aktivního místa enzymu (Tab. 7).

Tab. 7: Výsledky molekulového dockingu navržených struktur do vybraných enzymů.

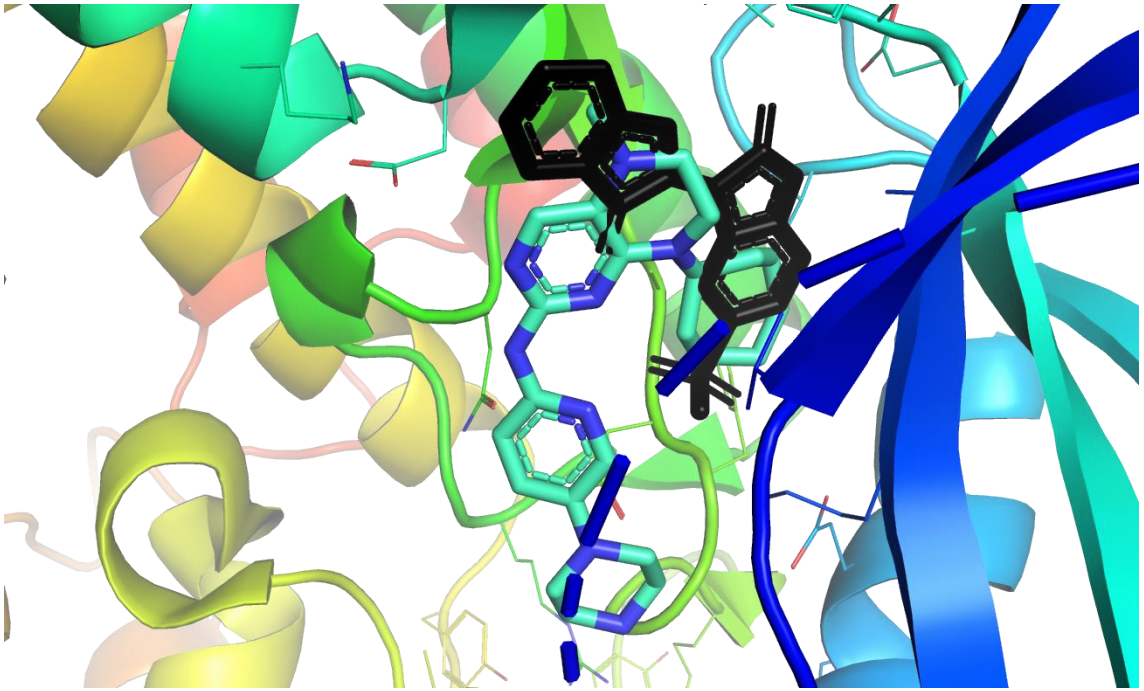
Struktura	Afinita k CDK2 [ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]		Afinita k CDK4 [ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]		Afinita k CDK6 [ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	
	Aktivní forma	Neaktivní forma	Aktivní forma	Neaktivní forma	Aktivní forma	Neaktivní forma
<b>34a</b>	-10,6	-7,6	-10,9	-7,5	-9,9	-8,5
<b>34b</b>	-10,4	-8,5	-10,4	-9,1	-9	-9,7
<b>34c</b>	-9,1	-8,3	-10,1	-8,7	-6,8	-8,5
<b>34d</b>	-9,5	-8,4	-11,1	-8,9	-9,8	-9,2
<b>34e</b>	-10,1	-7,8	-9,2	-8	-7	-8,3
<b>34f</b>	-10,5	-8,6	-10,4	-7,4	-7,5	-9
<b>34g</b>	-9,4	-8	-10,2	-7,5	-10,5	-9,8
<b>34h</b>	-9,7	-7,7	-10,3	-8,1	-9,8	-9,9
<b>34i</b>	-10,5	-8,6	-10,9	-8,8	-7,9	-9,3
<b>34j</b>	-9,5	-8,4	-11	-8,9	-9,7	-9,2



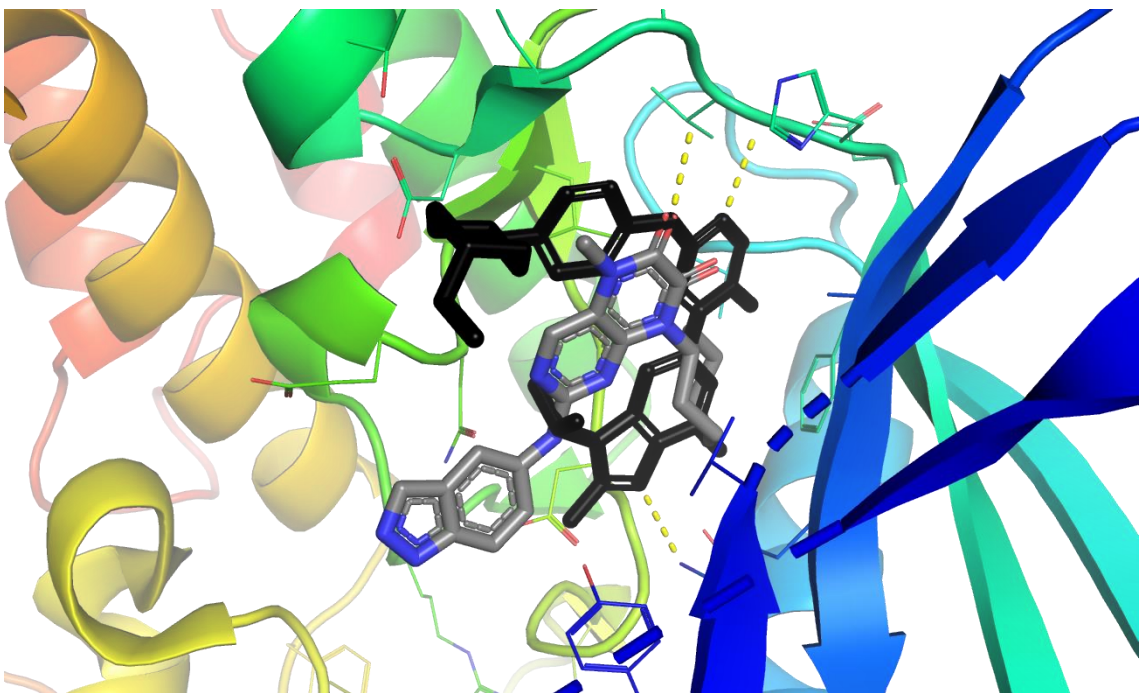
Obr. 10: Struktury dokovaných látek do vybraných enzymů.

Z těchto výsledků lze vidět, že v případě dockingu do CDK2 a CDK4 se jednotlivé deriváty váží silněji do aktivní formy daných enzymů. U navržených derivátů lze také pozorovat i určitá specifita. U derivátů, které se váží s vysokou afinitou do aktivní formy CDK2 vidíme, že se váží s nižší afinitou do aktivní formy CDK6. Naopak například derivát **34g** se váže s afinitou  $-10,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  do aktivní formy CDK6, ale do CDK2 pouze s afinitou  $-9,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . U CDK4 se s výjimkou struktury **34e** váží všechny deriváty se silnou vazebnou afinitou a není zde už taková specifita, protože je zde dobrá vazebná afinita i u CDK2.

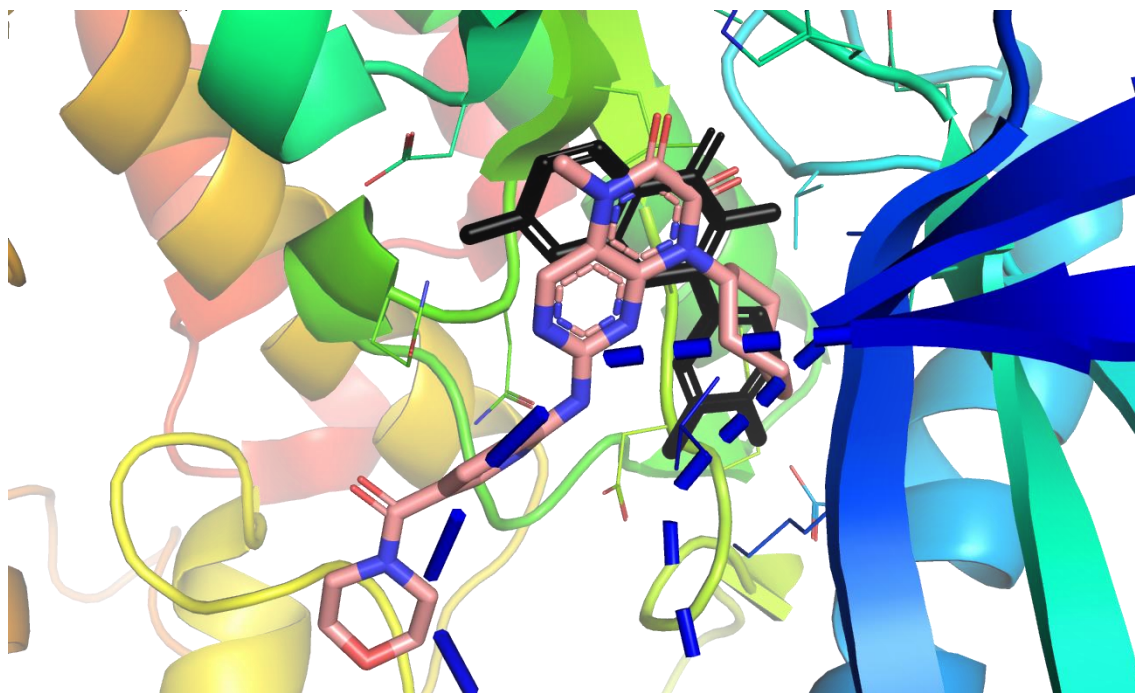
Z daných výsledků bychom mohli usoudit, že derivát **34e** by mohl být selektivní inhibitor pro enzym CDK2 (Obr. 11), derivát **34d** pro enzym CDK4 (Obr. 12) a derivát **34g** je z daných navržených derivátů nejvíce selektivní pro enzym CDK6 (Obr. 13).



Obr. 11: Zobrazení prostorové orientace látky **34e** (tyrkysová) do aktivní formy CDK2 (PDB ID 1E9H).



Obr.12: Zobrazení prostorové orientace látky **34d** (šedá) do aktivní formy CDK4 (PDB ID 7SJ3).



Obr. 13: Zobrazení prostorové orientace látky **34g** (růžová) do aktivní formy CDK6 (PDB ID 1X02).

### 3.6 Biologická aktivita

Připravené látky **37**, **34f** a **34h** byly odeslány na testování na jejich biologickou aktivitu na buněčných liniích (MV4-11, K562, MCF-7) a vybraných enzimech (CDK2/E, CDK4/D1 a FLT3-ITD).

S odbornou asistencí Mgr. Radka Jordy, Ph.D. a Mgr. Veroniky Vojáčkové jsem na buněčných liniích myeloidní leukémie MV4-11 a K562 mohl otestovat připravenou látku **34h**. První den byly připravené buňky spočítány, vhodně naředěny a vloženy do 96 jamkové desky. Na druhý den byly buňky ovlivněny látkou **34h** v různých koncentracích. Po 72 hodinách se k buňkám přidalo činidlo alamarBlue pro detekci živých buněk a provedla se detekce pomocí destičkového readeru a stanovení hodnot  $EC_{50}$  (polovina maximální účinné koncentrace). Výsledky z tohoto měření jsou zaznamenány v tabulce 7, ostatní výsledky biologické aktivity z časových důvodů uvedené nejsou.

Tab. 7: Naměřené hodnoty  $EC_{50}$  látky **34h**.

Buněčná linie	Hodnoty $EC_{50}$ [ $\mu$ M]
MV4-11	6,760
K562	49,254

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Obecné metody

Všechny reakce byly standardně prováděny, pokud není v postupu uvedeno jinak, na vzduchu za laboratorní teploty. Pro přípravu řady finálních derivátů byl také využit mikrovlnný reaktor CEM Discover SP. Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Pro TLC byly využívány aluminiové desky pokryté silikagelem 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem.

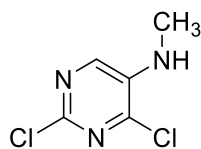
Po dokončení reakce byly produkty přečištěny využitím sloupcové chromatografie (CC). Jako stacionární fáze byl využit silikagel a směsi organických rozpouštědel jako mobilní fáze. Eluované frakce byly jímány do zkumavek a jejich obsah monitorován pomocí TLC. Frakce, které obsahovaly kýžený produkt, byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

Hmotnostní spektra připravených látek byla měřena na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). K měření NMR spekter byl použit spektrometr JEOL ECA400II pracující při frekvenci 399,78 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 100,53 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Měření jsou prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky jsou rozpuštěny a následně měřeny v  $\text{CDCl}_3$  nebo v  $\text{DMSO-}d_6$ .

U připravených finálních produktů byla dále měřena jejich teplota tání na bodotávku VEB Analytik Dresden PHMK 78/1586 a byly charakterizovány pomocí HRMS, což bylo měřeno na přístroji UHPLC Dionex Ultimate 3000 s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite.

### 4.2 Syntéza 2-amino-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **23**

#### 4.2.1 2,4-Dichloro- $N^5$ -methylpyrimidin-5-amin (**19**)



2,4-Dichloro-pyrimidin-5-amin **18** (5 g; 30,5 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (90 ml) a ochlazen na 0 °C. Ke směsi byla přidána ledová kyselina octová (10 ml; 183 mmol) a poté 37 % vodný roztok formaldehydu (2,7 ml; 36,6 mmol). Směs byla míchána 1 hodinu. Po 1 hodině byla směs vytažena z ledové lázně a bylo k ní přidáno dalších 20 ml ledové kyseliny octové. Po 3 hodinách byl ke směsi po dvou částech přidán  $\text{NaBH}_3\text{CN}$

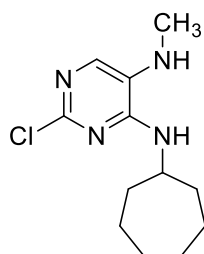


(4,6 g, 73,2 mmol) během 2 hodin. Po míchání po dobu 20 hodin byla směs zkoncentrována pomocí RVO, rozpuštěna ve vodě (100 ml) a ochlazená na ledové lázni. Následně byl za chlazení přidán pevný NaHCO<sub>3</sub> ke zneutralizování kyseliny octové. Vodná fáze byla extrahována s DCM (2x 80 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny nad MgSO<sub>4</sub> a odpařeny pomocí RVO. Pevný zbytek byl rozpuštěn v MeOH (10 ml) a vodě (80 ml) a ochlazen na ledové lázni. Po promíchání byla pevná látka zfiltrována a promyta vodou. Bylo získáno 3,79 g bílé pevné látky s výtěžkem 70 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.90 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 2.97 (d, *J* = 5.3 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.5, 146.0, 139.1, 138.7, 30.0.

#### 4.2.2 2-Chlor-*N*<sup>4</sup>-cykloheptyl-*N*<sup>5</sup>-methylpyrimidin-4,5-diamin (**20**)

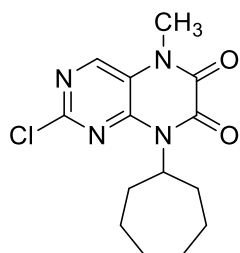


2,4-Dichloro-*N*<sup>5</sup>-methylpyrimidin-5-diamin **19** (0,71 mg; 4 mmol) byl rozpuštěn v BuOH (40 ml; 435 mmol). Ke směsi byl přidán cykloheptylamin (0,51 ml; 4 mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (1,4 ml; 8 mmol). Směs byla zahřívána za stálého míchání na 85 °C po dobu 4 dnů. Po ukončení reakce byla látka odpařena na RVO, rozpuštěna v malém množství DCM a vysrážena hexanem. Produkt byl poté pročištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan:EtOAc (3:2). Bylo získáno 713,9 mg bílé pevné látky s výtěžkem 70 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.46 (s, 1H), 4.88 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.26 – 4.14 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 2.74 (s, 1H), 2.08 – 1.94 (m, 2H), 1.74 – 1.40 (m, 10H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.4, 151.2, 135.5, 127.9, 51.6, 35.0, 31.1, 28.4, 24.1.

#### 4.2.3 2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**21**)



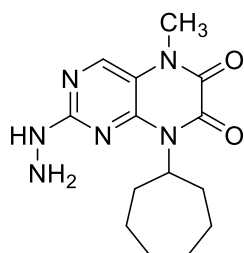
2-Chlor-*N*<sup>4</sup>-cykloheptyl-*N*<sup>5</sup>-methylpyrimidin-4,5-diamin **20** (777 mg; 3,06 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (46 ml) za inertních podmínek a vzniklá směs byla chlazená v ledové lázni. Ke směsi byl za stálého míchání přidán oxalylchlorid (0,27 ml; 3,12 mmol) a poté pomalu po kapkách 1 mol·l<sup>-1</sup> LiHMDS (7,34 ml; 7,34 mmol). Reakční směs byla míchána 7 dní za laboratorní teploty. Produkt byl odpařen na RVO a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan:EtOAc (1:1). Po odpaření bylo získáno 556 mg bílé krystalické látky s výtěžkem 60 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.34 (s, 1H), 5.31 – 5.26 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.53 – 2.41 (m, 2H), 2.02 – 1.82 (m, 2H), 1.81 – 1.73 (m, 2H), 1.73 – 1.56 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.3, 153.9, 153.0, 146.7, 143.2, 121.2, 57.8, 31.3, 29.7, 28.0, 26.2.

#### 4.2.4 8-Cykloheptyl-2-hydrazinyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion

**(24)**

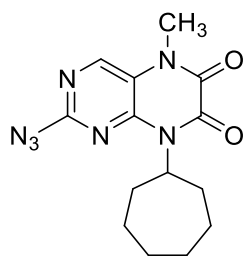


2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (400 mg; 1,3 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (2,08 ml; 35,62 mmol) a byl k němu přidán N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,13 ml; 2,6 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 60 °C a byla ponechána reagovat 5 hodin. Po ukončení reakce byla vzniklá žlutá sraženina odfiltrovaná a promyta ethanolem. Bylo získáno 276,9 mg žluté pevné látky se 70% výtěžkem.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.33 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 5.46 – 5.08 (m, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.48 – 2.26 (m, 2H), 1.83 – 1.67 (m, 4H), 1.66 – 1.42 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160.2, 155.3, 152.4, 145.5, 143.9, 113.9, 54.9, 30.7, 28.9, 27.5, 26.0.

#### 4.2.5 2-Azido-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**22**)

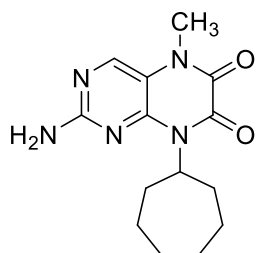


K 8-cykloheptyl-2-hydrazinyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dionu **24** (400 mg; 1,315 mmol) byla přidána 10% AcOH (20 ml; 0,35 mol), dále NaNO<sub>2</sub> (416 mg; 6,03 mmol) a 1M HCl (1,73 ml; 1,73 mmol). Reakční směs byla míchána 1 den. Látka byla zfiltrována a promyta vodou čímž bylo získáno 354,8 mg hnědé pevné látky s výtěžkem 86 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (s, 1H), 5.38 – 5.12 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.56 – 2.42 (m, 2H), 1.92 – 1.72 (m, 4H), 1.71 – 1.50 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.4, 154.6, 152.9, 146.7, 143.4, 119.0, 57.7, 31.4, 29.7, 27.9, 26.4.

#### 4.2.6 2-Amino-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**23**)



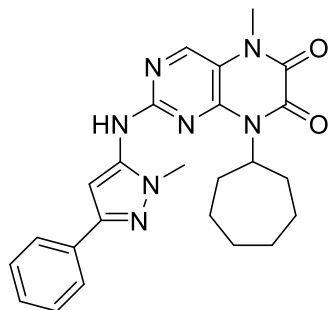
2-Azido-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **22** (200 mg; 0,63 mmol) byl rozpuštěn v EtOAc (20 ml) a byl ponechán probublávat po dobu 5 minut proudem dusíku. Poté bylo k látce přidáno 10% palladium na aktivním uhlí (33,76 mg; 0,32 mmol) a směs byla opět probublána proudem dusíku. Následně byl ke směsi připojen balónek s vodíkem a směs byla míchána přes noc. Po ukončení reakce byl produkt přefiltrován, odpařen a následně byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (20:1). Bylo získáno 138,2 mg žluté pevné látky s výtěžkem 77 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.24 (s, 1H), 6.58 (s, 2H), 5.32 – 5.13 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.45 – 2.25 (m, 2H), 1.83 – 1.63 (m, 4H), 1.61 – 1.51 (m, 4H), 1.51 – 1.38 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.0, 155.1, 152.2, 145.3, 144.0, 113.4, 54.8, 31.5, 28.7, 27.5, 25.8.

### 4.3 Syntéza finálních derivátů

#### 4.3.1 8-Cykloheptyl-5-methyl-2-((1-methyl-3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**34b**)



2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (56 mg; 0,18 mmol) byl navážen do vialky pro mikrovlnný reaktor a rozpuštěn v 1 ml směsi 1,4-dioxanu s vodou v poměru 4:1. Poté byl do vialky přidán 1-methyl-3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-amin **39** (31,52 mg; 0,18 mmol) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100,6 mg; 0,73 mmol). Po probublání směsi proudem dusíku po dobu 10 minut byl přidán prekatalyzátor XPhos Pd G2 (3 mg; 2 mol %). Směs byla reagována v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byl produkt naředěn vodou (20 ml) a vodná fáze byla extrahována 3x 15 ml DCM. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (20:1) byl získán produkt ve formě žluté olejovité látky, který byl dále rozpuštěn v malém množství DCM, vysrážen hexanem a zfiltrován. Bylo získáno 23,2 mg žluté pevné látky s výtěžkem 29 %.

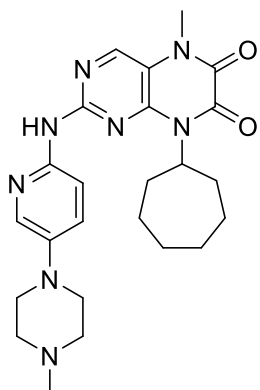
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 (s, 1H), 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.42 – 7.33 (m, 2H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.27 – 5.15 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 2.43 – 2.24 (m, 2H), 1.79 – 1.59 (m, 4H), 1.54 – 1.38 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.2, 155.1, 152.9, 150.3, 146.5, 143.4, 138.0, 133.6, 128.7, 127.8, 125.4, 116.1, 97.8, 57.26, 35.6, 31.3, 29.4, 27.7, 26.5.

HRMS (ESI-TOF) m/z vypočteno pro [M+H]<sup>+</sup>: 446,2299; nalezeno 446,2282.

Teplota tání 139-141 °C.

#### 4.3.2 8-Cykloheptyl-5-methyl-2-((5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**34f**)



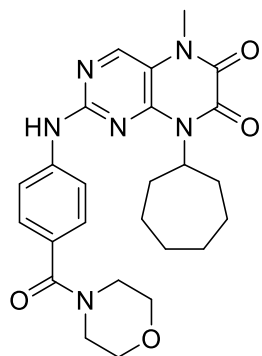
2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (112 mg; 0,36 mmol) byl navážen do vialky pro mikrovlnný reaktor a rozpuštěn v 2 ml směsi 1,4-dioxanu s vodou v poměru 4:1. Poté byl do vialky přidán 5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridin-2-amin **36** (70 mg; 0,36 mmol) a  $K_2CO_3$  (200 mg; 1,4 mmol). Po probublání směsi proudem dusíku po dobu 10 minut byl do vialky přidán prekatalyzátor XPhos Pd G2 (6 mg; 2 mol %). Směs byla reagována v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byl produkt naředěn vodou (30 ml) a vodná fáze extrahována 3x 20 ml DCM. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (5:1) bylo získáno 44,1 mg žluté pevné látky s výtěžkem 26 %. Kvůli špatné rozpustnosti látky pro NMR analýzu byl produkt převeden na hydrochlorid rozpuštěním v 6 ml MeOH nasyceného plynným HCl a byl takto ponechán reagovat za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Po ukončení reakce byl produkt odfoukán dusíkem a poté ještě 3x promyt čistým MeOH a opět odfoukán.

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.35 (s, 2H), 8.49 (s, 1H), 8.07 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.87 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 5.33 – 5.14 (m, 1H), 3.87 – 3.78 (m, 4H), 3.54 (s, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.27 – 3.12 (m, 4H), 2.81 (d,  $J = 3.8$  Hz, 3H), 2.46 – 2.31 (m, 2H), 1.87 – 1.71 (m, 4H), 1.68 – 1.55 (m, 2H), 1.54 – 1.43 (m, 2H).

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  vypočteno pro  $[M+H]^+$ : 465,2721; nalezeno 465,2722.

Teplota tání 151-153 °C.

### 4.3.3 8-Cykloheptyl-5-methyl-2-((4-(morfolino-4-karboxyl)fenyl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**34h**)



2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (27 mg; 0,09 mmol) byl navážen do vialky pro mikrovlnný reaktor a rozpuštěn v 500  $\mu$ l 1,4-dioxanu s vodou v poměru 4:1. Poté byl do vialky přidán (4-aminofenyl)(morfolino)methanon **41** (18,6 mg; 0,09 mmol) a  $K_2CO_3$  (50 mg; 0,36 mmol). Po probublání směsi proudem dusíku po dobu 10 minut byl do vialky přidán prekatalyzátor XPhos Pd G2 (1,42 mg; 2 mol Směs byla reagována v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byl produkt naředěn vodou (15 ml) a vodná fáze extrahována 3x 10 ml DCM. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (30:1) byl získán produkt ve formě oranžové olejovité látky, který byl dále rozpuštěn v DCM (1 ml), vysrážen hexanem a zfiltrován. Bylo získáno 25,3 mg bílé pevné látky s výtěžkem 59 %.

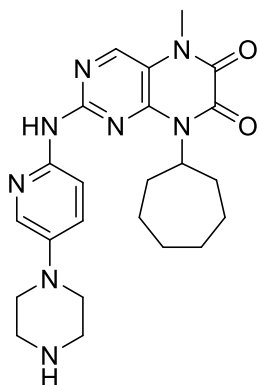
$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.26 (s, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 2H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 5.44 – 5.34 (m, 1H), 3.77 – 3.63 (m, 8H), 3.60 (s, 3H), 2.59 – 2.46 (m, 2H), 1.96 – 1.77 (m, 4H), 1.74 – 1.63 (m, 4H), 1.57 – 1.48 (m, 2H).

$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  169.1, 155.1, 154.6, 152.7, 145.4, 143.8, 141.9, 128.1, 127.8, 117.7, 115.7, 66.1, 55.5, 30.5, 28.9, 27.5, 26.2.

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  vypočteno pro  $[M+H]^+$ : 479,2401; nalezeno 479,2403.

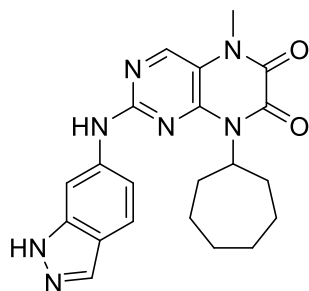
Teplota tání 145-146 °C.

#### 4.3.4 8-Cykloheptyl-5-methyl-2-((5-(piperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**34e**)



2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (110,9 mg; 0,36 mmol) byl navážen do vialky pro mikrovlnný reaktor a rozpuštěn v 2 ml směsi 1,4-dioxanu s vodou v poměru 4:1. Poté byl do vialky přidán *tert*-butyl 4-(6-aminopyridin-3-yl)piperazin-1-karboxylát **42** (100,21 mg; 0,36 mmol) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 mg; 1,4 mmol). Po probublání směsi proudem dusíku po dobu 10 minut byl do směsi přidán prekatalyzátor XPhos Pd G2 (6 mg; 2 mol %). Směs byla reagována v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byl produkt naředěn vodou (30 ml) a vodná fáze extrahována 3x 15 ml DCM. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (40:1) byl získán *tert*-butyl 4-(6-((8-cykloheptyl-5-methyl-6,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahydropteridin-2-yl)amino)pyridin-3-yl)piperazin-1-karboxylát **35** s výtěžkem 47,4 mg (24 %). Produkt **35** (40 mg; 0,073 mmol) byl rozpuštěn ve 1,4 ml směsi DCM:MeOH v poměru 1:1. Po rozpuštění bylo po kapkách přidána 35% HCl (0,12 ml) a směs byla ponechána reagovat za stálého míchání po dobu 2 dní. Po ukončení reakce byla směs neutralizována uhličitanem draselným a poté naředěna vodou (5 ml), čímž zároveň došlo k vysrážení produktu. Po zfiltrování bylo získáno 15,9 mg produktu ve formě žluté pevné látky, což odpovídá výtěžku 49 %.

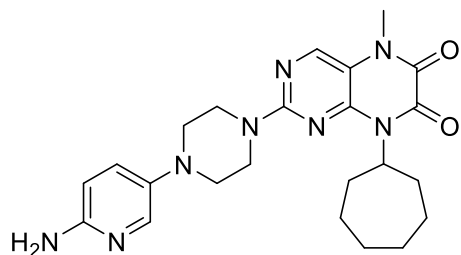
#### 4.3.5 2-((1*H*-Indazol-6-yl)amino)-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**34j**)



2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (110,9 mg; 0,36 mmol) byl navážen do vialky pro mikrovlnný reaktor a rozpuštěn v 2 ml směsi 1,4-dioxanu s vodou v poměru 4:1. Poté byl do vialky přidán *tert*-butyl 6-amino-1*H*-indazol-1-karboxylát **43** (84 mg; 0,36 mmol) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 mg; 1,4 mmol). Po probublání směsi proudem dusíku po dobu 10 minut byl do směsi přidán prekatalyzátor XPhos Pd G2 (6 mg; 2 mol %). Směs byla reagována v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 5 minut. Po ukončení reakce byl produkt naředěn vodou (30 ml) a vodná fáze extrahována 3x 20 ml DCM. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM:MeOH (80:1) a odpaření na RVO bylo získáno 58,9 mg *tert*-butyl 6-((8-cykloheptyl-5-methyl-6,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahydropteridin-2-yl)amino)-1*H*-indazol-1-karboxylátu **44** s výtěžkem 32 %. Produkt **44** (23 mg; 0,045 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml směsi DCM:MeOH v poměru 1:1. Po rozpuštění bylo po kapkách přidáno 75 µl 35% HCl a směs byla ponechána reagovat za stálého míchání po dobu 2 dní. Po ukončení reakce byla směs neutralizována uhličitanem draselným a poté naředěna vodou (5 ml). Látka byla poté extrahována 2x 10 ml DCM a po odpaření přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází DCM:MeOH (30:1), čímž bylo získáno 7,4 mg žluté pevné látky s výtěžkem 40 %.



#### 4.3.6 2-(4-(6-Aminopyridin-3-yl)piperazin-1-yl)-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (**37**)



2-Chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion **21** (56 mg; 0,18 mmol) byl rozpuštěn v DMF (0,6 ml). Poté byl ke směsi přidán 5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridin-2-amin **36** a vzniklá směs byla za stálého míchání zahřívána po dobu 24 h na 85 °C. Po ukončení reakce byla směs naředěna vodou (20 ml) a extrahována 2x 10 ml EtOAc. Poté byla látka přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází DCM:MeOH (15:1) a přečištění bylo získáno 35,6 mg žluté pevné látky s výtěžkem 42 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.18 (s, 1H), 7.83 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.23 (dd,  $J = 8.8, 2.9$  Hz, 1H), 6.51 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.38 – 5.25 (m, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.99 – 3.93 (m, 4H), 3.57 (s, 3H), 3.13 – 3.09 (m, 4H), 2.58 – 2.43 (m, 2H), 1.89 – 1.72 (m, 4H), 1.69 – 1.47 (m, 6H).

## 5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit nové dihydropteridinové deriváty lišící se od sebe substituentem v poloze 2, a které byly navrženy podle strukturních vlastností určených podle molekulového dockingu léčiva palbociclibu. Celkem bylo připraveno 5 finálních derivátů (**34b**, **34f**, **34h**, **34e** a **34j**) pomocí Buchwald-Hartwigovy aminace v mikrovlnném reaktoru. Tyto deriváty však byly připraveny s poměrně nízkými výtěžky (26-59 %), ale s požadovanou čistotou. Zbylé navržené deriváty se připravit nepodařilo, protože podle HPLC docházelo při jejich přípravě k otevírání cyklu a rozpadu dihydropteridinového skeletu. Deriváty **34e** a **34j** se po deprotekcí podařilo získat pouze ve velmi nízkém množství a kvůli problémům s rozpustností v činidlech potřebných pro NMR analýzu se je nepodařilo charakterizovat.

Další částí bakalářské práce bylo provedení molekulového dockingu navržených derivátů do aktivních a neaktivních forem enzymů CDK2, CDK4 a CDK6. Dokované deriváty se lépe vázaly do aktivní formy enzymů. Zároveň se ukázalo, že látky, které se váží s vysokou afinitou do CDK2, se váží s nižší afinitou do CDK6 a naopak. Z těchto derivátů se látka **34e** jeví jako potenciální selektivní inhibitor CDK2, látka **34d** jako selektivní inhibitor CDK4 a látka **34g** jako inhibitor CDK6.

Připravené deriváty **34f** a **34h** společně s látkou **37** byly poslány na testování na jejich biologickou aktivitu na buněčných liniích MV4-11, K562 a MCF-7 a vybraných enzymech CDK2/E, CDK4/D1 a FLT3-ITD. V rámci této bakalářské práce jsem si také vyzkoušel, jak probíhá biologické testování připraveného derivátu **34h** na buněčných liniích MV4-11 a K562.

## 6 LITERATURA

- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., & Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 14, Issue 2, pp. 130–146). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4504>
- Bhatnagar, A. S. (2007). The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Research and Treatment*, 105(S1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9696-3>
- Bose, P., Simmons, G. L., & Grant, S. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor therapy for hematologic malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(6), 723–738. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.789859>
- Breault, G. A., Comita-Prevoir, J., Eyermann, C. J., Geng, B., Petrichko, R., Doig, P., Gorseth, E., & Noonan, B. (2008). Exploring 8-benzyl pteridine-6,7-diones as inhibitors of glutamate racemase (MurI) in Gram-positive bacteria. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(23), 6100–6103. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.10.022>
- Bross, P. F., Cohen, M. H., Williams, G. A., & Pazdur, R. (2002). FDA Drug Approval Summaries: Fulvestrant. *The Oncologist*, 7(6), 477–480. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.7-6-477>
- Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>
- Burton, C., Shi, H., & Ma, Y. (2016). Daily variation and effect of dietary folate on urinary pteridines. *Metabolomics*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1019-4>
- Carmona-Martínez, V., Ruiz-Alcaraz, A. J., Vera, M., Guirado, A., Martínez-Esparza, M., & García-Peñarrubia, P. (2019). Therapeutic potential of pteridine derivatives: A comprehensive review. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 39, Issue 2, pp. 461–516). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/med.21529>
- Chen, P., Lee, N. V., Hu, W., Xu, M., Ferre, R. A., Lam, H., Bergqvist, S., Solowiej, J., Diehl, W., He, Y. A., Yu, X., Nagata, A., Vanarsdale, T., & Murray, B. W. (2016). Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(10), 2273–2281. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0300>
- Chen, P., Xu, Y., Li, X., Yao, H., & Lin, K. (2020). Development and strategies of CDK4/6 inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 12(2), 127–145. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0062>
- Chohan, T. A., Qayyum, A., Rehman, K., Tariq, M., & Akash, M. S. H. (2018). An insight into the emerging role of cyclin-dependent kinase inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of advanced cancers. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 107, pp. 1326–1341). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.116>
- Cicenas, J., Kalyan, K., Sorokinas, A., Stankunas, E., Levy, J., Meskinyte, I., Stankevicius, V., Kaupinis, A., & Valius, M. (2015). Roscovitine in cancer and other diseases. In *Annals of Translational Medicine* (Vol. 3, Issue 10). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61>
- Dar, A. M., & Mir, S. (2017). Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 08(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000356>
- Dhillon, S. (2015). Palbociclib: First global approval. *Drugs*, 75(5), 543–551. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0379-9>
- Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 1, Issue 3, pp. 226–231). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/cbt.72>
- Finn, R. S., Martin, M., Rugo, H. S., Jones, S., Im, S.-A., Gelmon, K., Harbeck, N., Lipatov, O. N., Walshe, J. M., Moulder, S., Gauthier, E., Lu, D. R., Randolph, S., Diéras, V., & Slamon, D. J. (2016). Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New*

- England Journal of Medicine*, 375(20), 1925–1936.  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1607303>
- Fröhlich, L. G., Kotsonis, P., Traub, H., Taghavi-Moghadam, S., Al-Masoudi, N., Hofmann, H., Strobel, H., Matter, H., Pflleiderer, W., & Schmidt, H. H. H. W. (1999). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 4-amino pteridine derivatives: Structure-activity relationship of antagonists of (6R)-5,6,7,8- tetrahydrobiopterin cofactor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(20), 4108–4121. <https://doi.org/10.1021/jm981129a>
- Geng, P. F., Wang, C. C., Li, Z. H., Hu, X. N., Zhao, T. Q., Fu, D. J., Zhao, B., Yu, B., & Liu, H. M. (2018). Design, synthesis and preliminary biological evaluation of 5,8-dihydropteridine-6,7-diones that induce apoptosis and suppress cell migration. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1959–1967. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.009>
- Herrera-Abreu, M. T., Palafox, M., Asghar, U., Rivas, M. A., Cutts, R. J., Garcia-Murillas, I., Pearson, A., Guzman, M., Rodriguez, O., Grueso, J., Bellet, M., Cortés, J., Elliott, R., Pancholi, S., Baselga, J., Dowsett, M., Martin, L. A., Turner, N. C., & Serra, V. (2016). Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Research*, 76(8), 2301–2313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0728>
- Hinds, P. W. (1995). The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(1), 79–83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(95\)90057-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X(95)90057-8)
- Kim, E. S. (2017). Abemaciclib: First Global Approval. *Drugs*, 77(18), 2063–2070. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0840-z>
- Knudsen, E. S., & Witkiewicz, A. K. (2017). The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. In *Trends in Cancer* (Vol. 3, Issue 1, pp. 39–55). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.006>
- Koshland, D. E. (1963). Correlation of Structure and Function in Enzyme Action. *Science*, 142(3599), 1533–1541. <https://doi.org/10.1126/science.142.3599.1533>
- Krystof, V., & Uldrijan, S. (2010). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Current Drug Targets*, 11(3), 291–302. <https://doi.org/10.2174/138945010790711950>
- Lamb, H. M., & Adkins, J. C. (1998). Letrozole. *Drugs*, 56(6), 1125–1140. <https://doi.org/10.2165/00003495-199856060-00020>
- Li, Z., Razavi, P., Li, Q., Toy, W., Liu, B., Ping, C., Hsieh, W., Sanchez-Vega, F., Brown, D. N., Da Cruz Paula, A. F., Morris, L., Selenica, P., Eichenberger, E., Shen, R., Schultz, N., Rosen, N., Scaltriti, M., Brogi, E., Baselga, J., ... Chandarlapaty, S. (2018). Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell*, 34(6), 893-905.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.006>
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. In *Development (Cambridge)* (Vol. 140, Issue 15, pp. 3079–3093). <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Liu, M., Liu, H., & Chen, J. (2018). Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review). *Oncology Reports*, 39(3), 901–911. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6221>
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6). <https://doi.org/10.1186/gb4184>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 30, Issue 11, pp. 630–641). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 9, Issue 3, pp. 153–166). <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. In *Cell* (Vol. 129, Issue 7, pp. 1261–1274). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>

- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., & Kato, J.-Y. (1994). D-Type Cyclin-Dependent Kinase Activity in Mammalian Cells. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 14, Issue 3).
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G., & Moulinoux, J. P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*, *243*(1–2), 527–536. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00527.x>
- Michaloglou, C., Crafter, C., Siersbaek, R., Delpuech, O., Curwen, J. O., Carnevalli, L. S., Staniszewska, A. D., Polanska, U. M., Cheraghchi-Bashi, A., Lawson, M., Chernukhin, I., McEwen, R., Carroll, J. S., & Cosulich, S. C. (2018). Combined inhibition of mtor and cdk4/6 is required for optimal blockade of e2f function and long-term growth inhibition in estrogen receptor–positive breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *17*(5), 908–920. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0537>
- Novikov, F. N., & Chilov, G. G. (2009). Molecular docking: theoretical background, practical applications and perspectives. *Mendeleev Communications*, *19*(5), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2009.09.001>
- Ohmori, J., Kubota, H., Shimizu-Sasamata, M., Okada, M., & Sakamoto, S. (1996). Novel  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate Receptor Antagonists: Synthesis and Structure–Activity Relationships of 6-(1H-Imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H,4H)-pyrido[2,3-b]pyrazinedione and Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, *39*(6), 1331–1338. <https://doi.org/10.1021/jm950304+>
- O’Leary, B., Finn, R. S., & Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *13*(7), 417–430. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. In *Biophysical Reviews* (Vol. 9, Issue 2, pp. 91–102). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Pandey, K., An, H. J., Kim, S. K., Lee, S. A., Kim, S., Lim, S. M., Kim, G. M., Sohn, J., & Moon, Y. W. (2019). Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. In *International Journal of Cancer* (Vol. 145, Issue 5, pp. 1179–1188). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ijc.32020>
- Pfleiderer, W. (1984). 2.16 - Pteridines. In A. R. Katritzky & C. W. Rees (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (pp. 263–327). Pergamon. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00038-2>
- Pfleiderer, W. (1992). Pteridines. Properties, reactivities and biological significance. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, *29*(3), 583–605. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570290301>
- Poratti, M., & Marzaro, G. (2019). Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 172, pp. 143–153). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.064>
- Rembold, H., & Gyure, W. L. (1972). Biochemistry of the Pteridines. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *11*(12), 1061–1072. <https://doi.org/10.1002/anie.197210611>
- Roskoski, R. (2019). Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. In *Pharmacological Research* (Vol. 139, pp. 471–488). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.035>
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, *35*(6), 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Shortnacy-Fowler, A. T., Tiwari, K. N., Montgomery, J. A., & Secrist, J. A. (2001). Synthesis and biological activity of 4'-C-hydroxymethyl-2' fluoro-D-arabinofuranosylpurine nucleosides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, *20*(4–7), 747–750. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002421>
- Sledge, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., Burdaeva, O., Okera, M., Masuda, N., Kaufman, P. A., Koh, H., Grischke, E.-M., Frenzel, M., Lin, Y., Barriga,

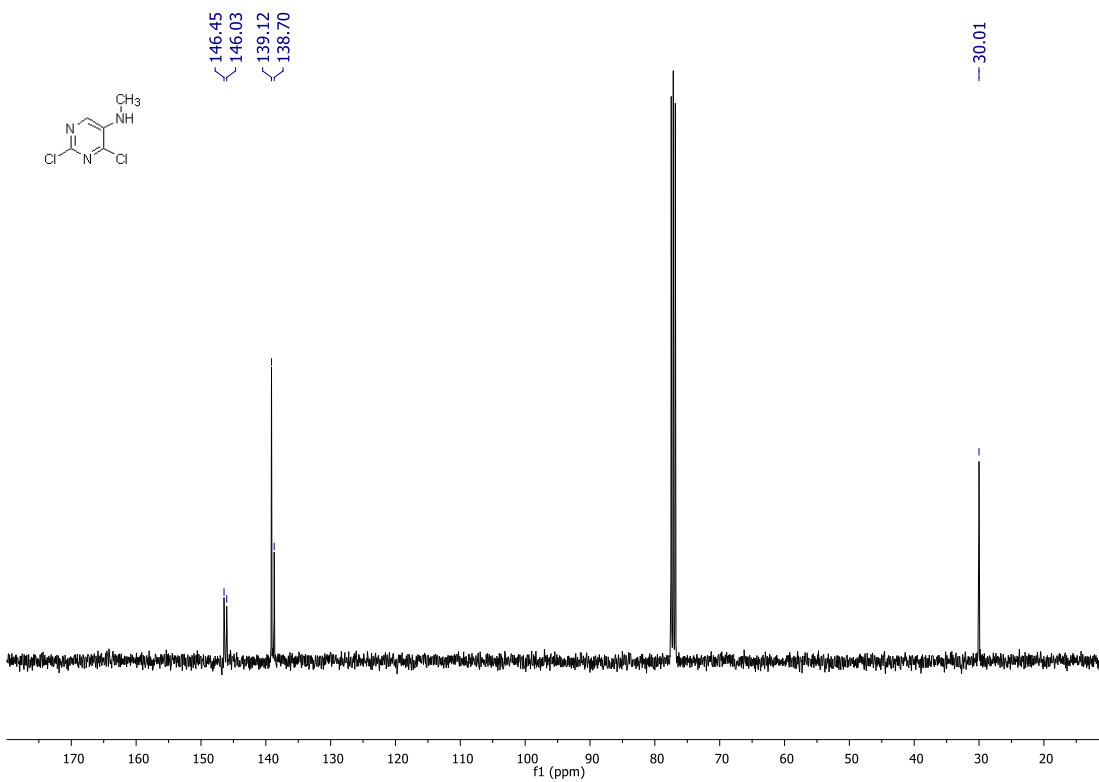
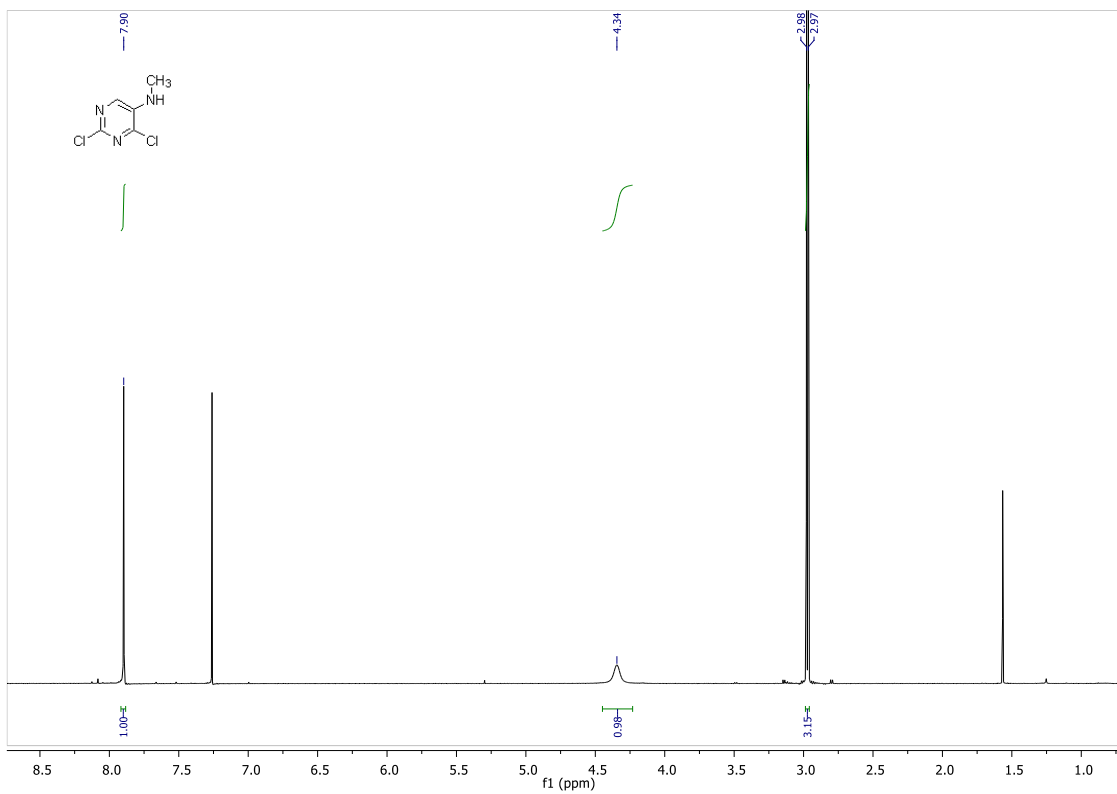
- S., Smith, I. C., Bourayou, N., & Llombart-Cussac, A. (2017). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *J Clin Oncol*, 35, 2875–2884. <https://doi.org/10.1200/JCO>
- Steklov, M. Yu., Tararov, V. I., Romanov, G. A., & Mikhailov, S. N. (2011). Facile Synthesis of 8-Azido-6-Benzylaminopurine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 30(7–8), 503–511. <https://doi.org/10.1080/15257770.2011.602655>
- Suckling, C., Gibson, C., & Huggan, J. (2008). Bicyclic 6-6 Systems: Pteridines. In A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, E. F. V Scriven, & R. J. K. Taylor (Eds.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III* (pp. 915–975). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008044992-0.00918-4>
- Syed, Y. Y. (2017). Ribociclib: First Global Approval. *Drugs*, 77(7), 799–807. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0742-0>
- Taghavi-Moghadam, S., & Pfeleiderer, W. (1997). A New, General and Regioselective Method for the Synthesis of 2,6-Disubstituted 4-Aminopteridines. In *Tetrahedron Letters* (Vol. 38, Issue 39).
- Tomanová, M., Kozlanská, K., Jorda, R., Jedinák, L., Havlíková, T., Řezníčková, E., Peřina, M., Klener, P., Dolníková, A., Cankař, P., & Kryštof, V. (2022). Synthesis and Structural Optimization of 2,7,9-Trisubstituted purin-8-ones as FLT3-ITD Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232416169>
- Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>
- Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P., & Clarke, P. A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 173, pp. 83–105). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>
- Xu, H., Wang, Y., Han, Y., Wu, Y., Wang, J., & Xu, B. (2022). CDK4/6 inhibitors versus PI3K/AKT/mTOR inhibitors in women with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: An updated systematic review and network meta-analysis of 28 randomized controlled trials. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.956464>
- Yamamoto, T., Kanaya, N., Somlo, G., & Chen, S. (2019). Synergistic anti-cancer activity of CDK4/6 inhibitor palbociclib and dual mTOR kinase inhibitor MLN0128 in pRb-expressing ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(3), 615–625. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05104-9>
- Yuan, K., Wang, X., Dong, H., Min, W., Hao, H., & Yang, P. (2021). Selective inhibition of CDK4/6: A safe and effective strategy for developing anticancer drugs. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 11, Issue 1, pp. 30–54). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.05.001>
- Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Li, X., Cai, H., Wu, X., Zheng, Q., & Cai, C. (2021). CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. In *Am J Cancer Res* (Vol. 11, Issue 5). [www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AcOH	octová kyselina
AKT1	protein kinasa B
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-propionát
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CDK	cyklin-dependentní kinasa
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>dppf</i>	1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ER	estrogenový receptor
Et3N	triethylamin
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
FDA	Food and Drug Administration
HBTU	O-(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> -tetramethyluronium hexafluorofosfát
HOBt	hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	high-resolution mass spectrometry
IA	inhibitor aromatasy
LiHMDS	bis(trimethylsilyl)amid lithný
MeOH	methanol
mTOR	savčí cíl rapamycinu
Murl	bakteriální enzym glutamátracemasa
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pd(OAc) <sub>2</sub>	octan palladnatý
PDB	Protein Data Bank
PI3K	fosfatidylinositol 3 - kinasa
PPh <sub>3</sub>	trifenylfosfin
pRb	retinoblastomový protein
RVO	rotační vakuová odparka
T3P	anhydrid kyseliny propanfosfonové
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
XPhos Pd G2	chloro(2-dicyklohexylfosfino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-bifenyl)[2-(2'-amino-1,1'-bifenyl)]palladium(II)

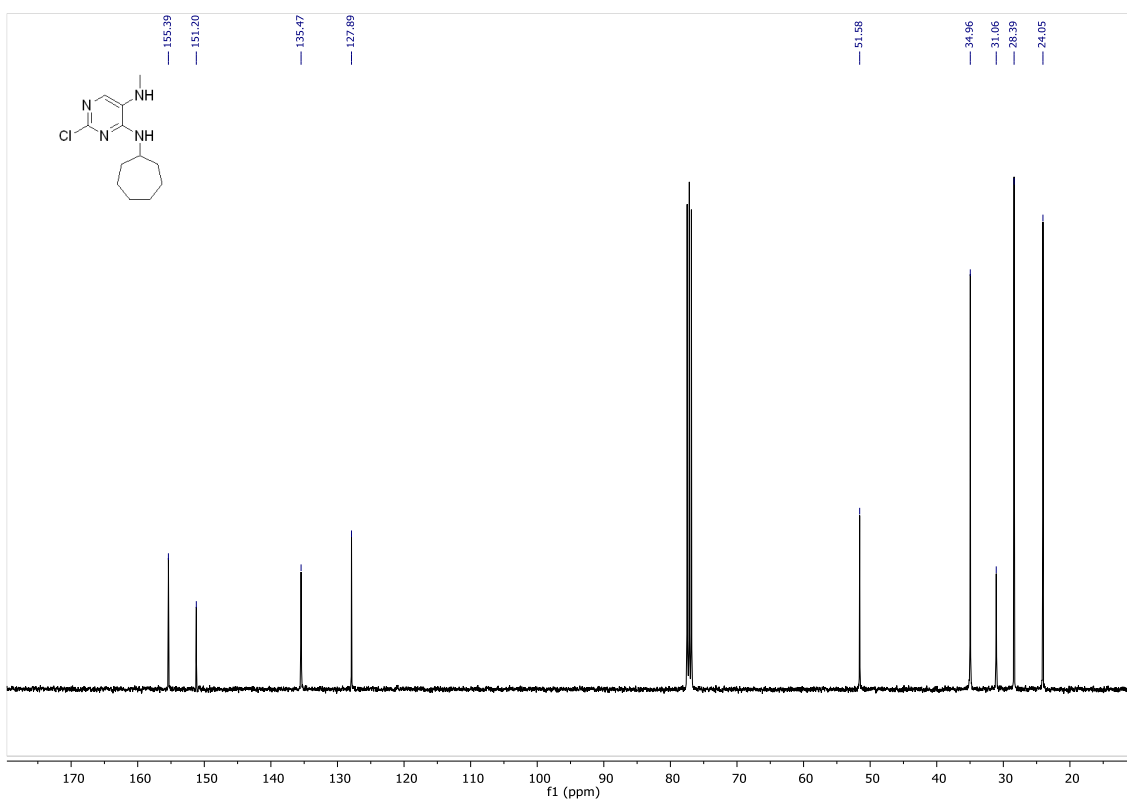
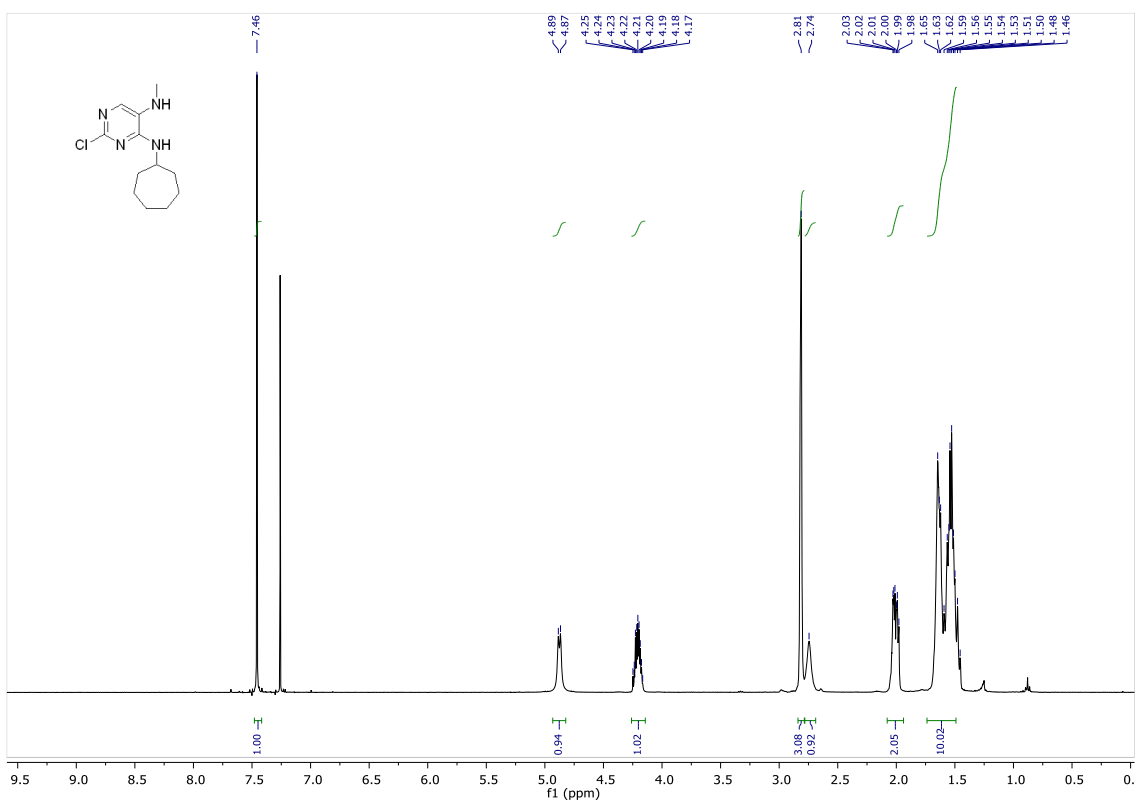
## 8 PŘÍLOHY

### $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektrum 2,4-dichloro- $N^5$ -methylpyrimidin-5-amin (19)

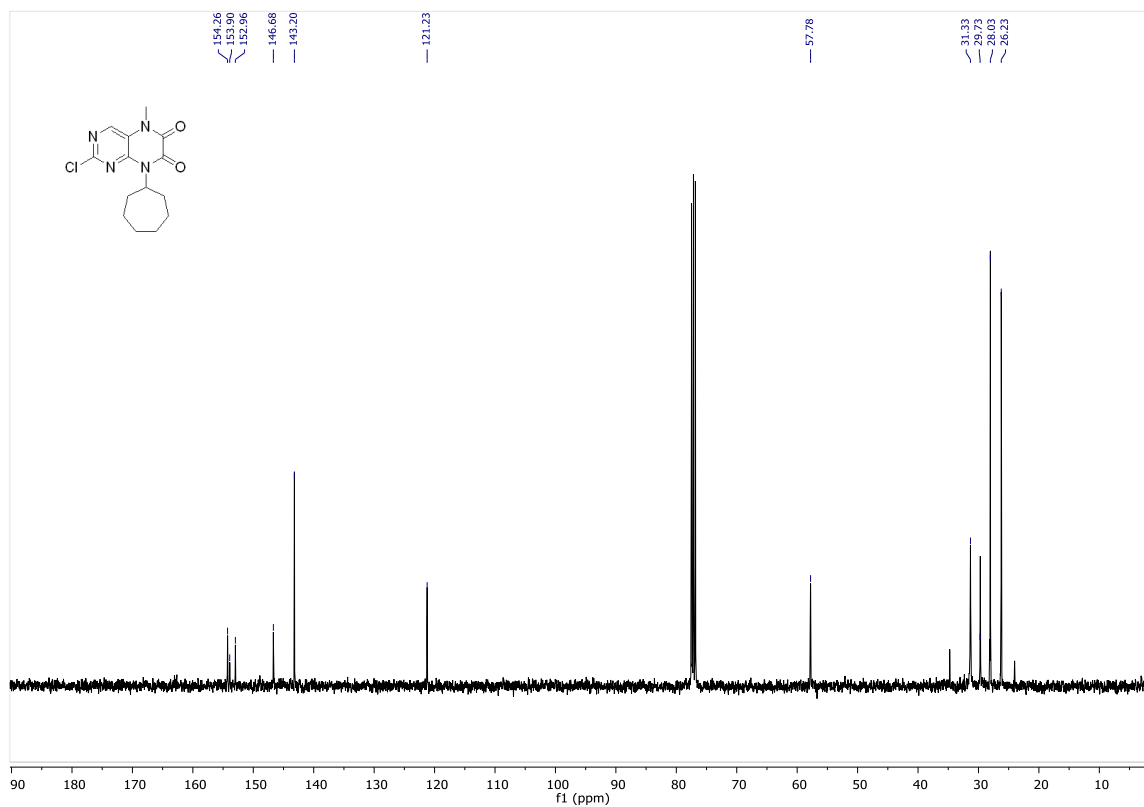
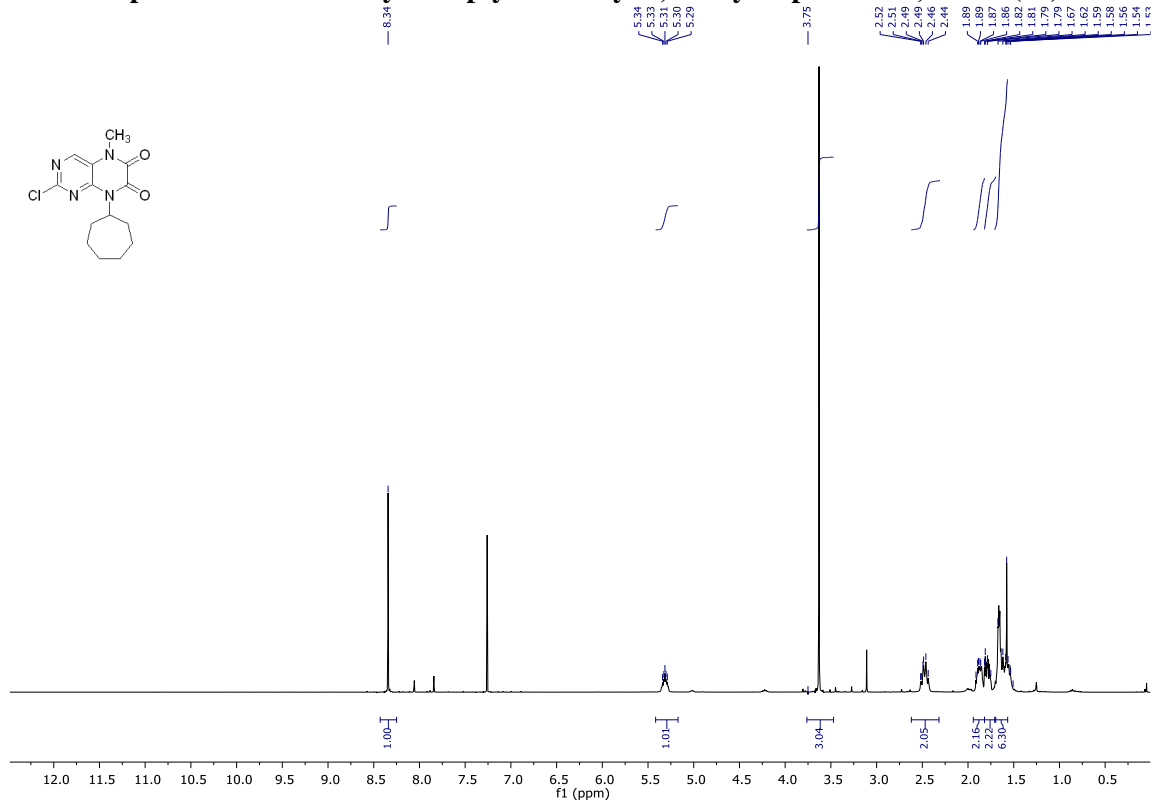




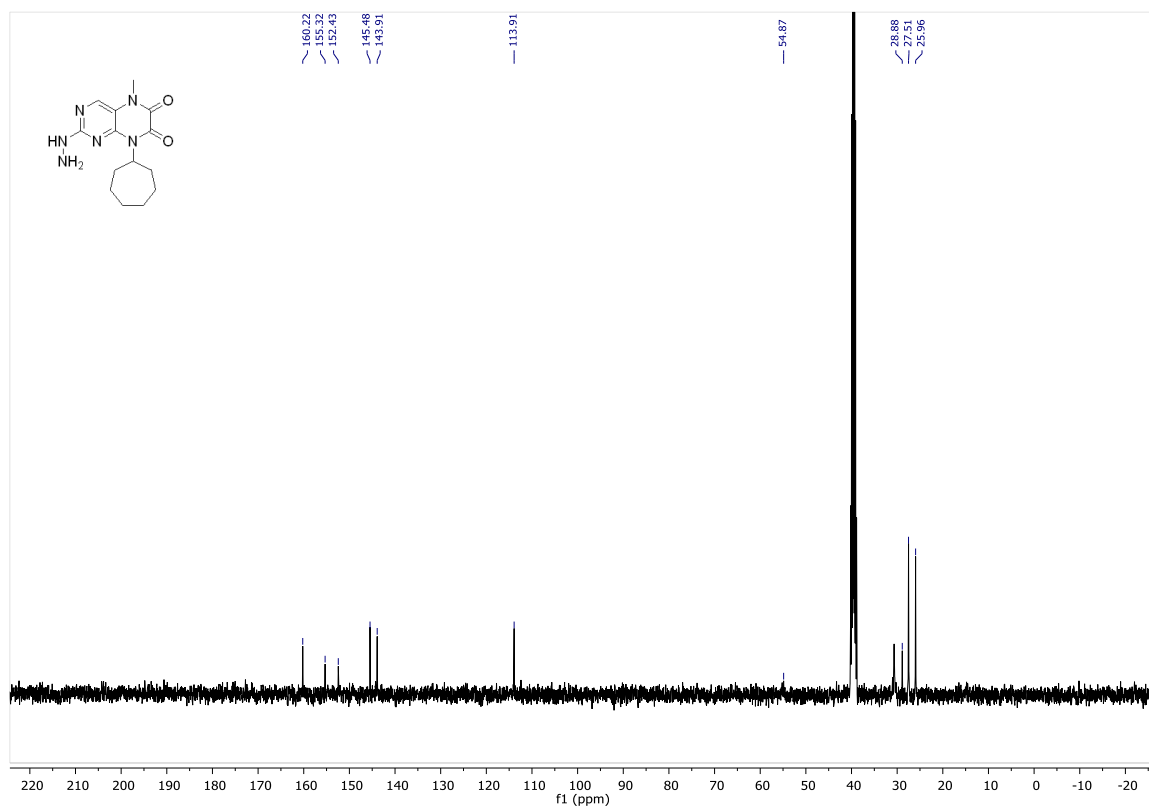
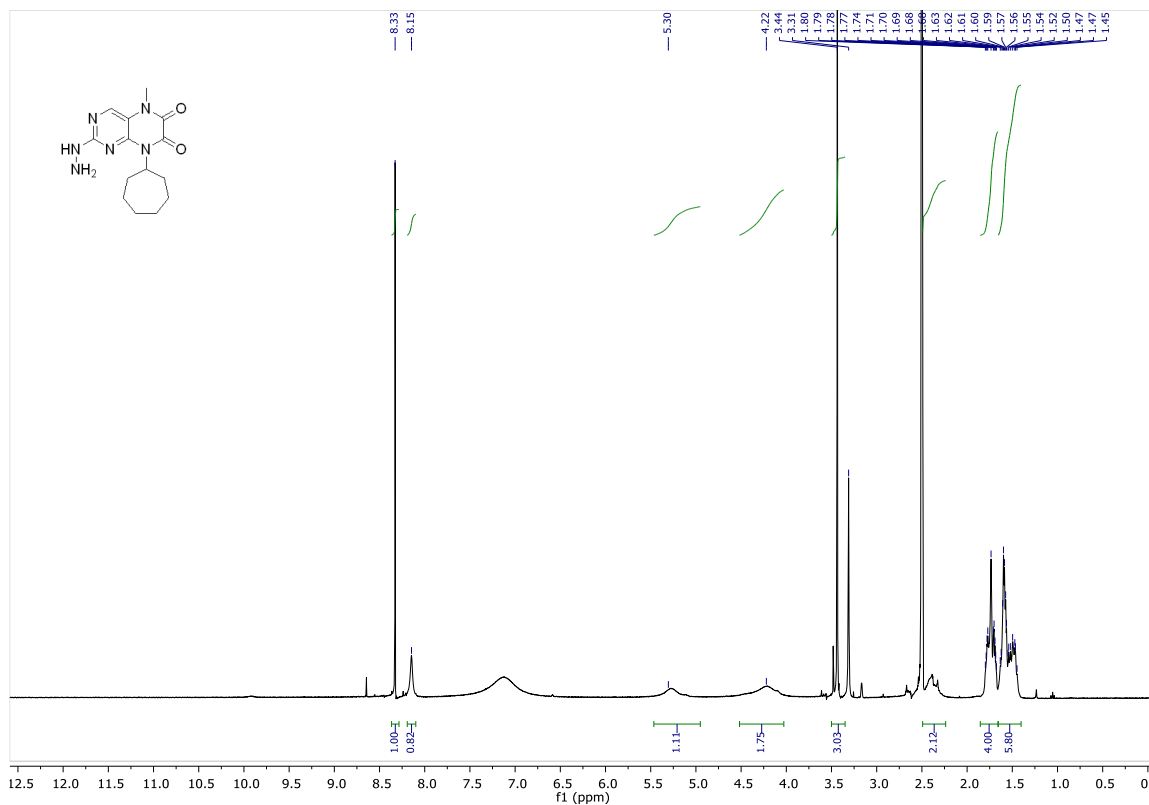
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 2-chlor- $N^4$ -cykloheptyl- $N^5$ -methylpyrimidin-4,5-diamin (20)**



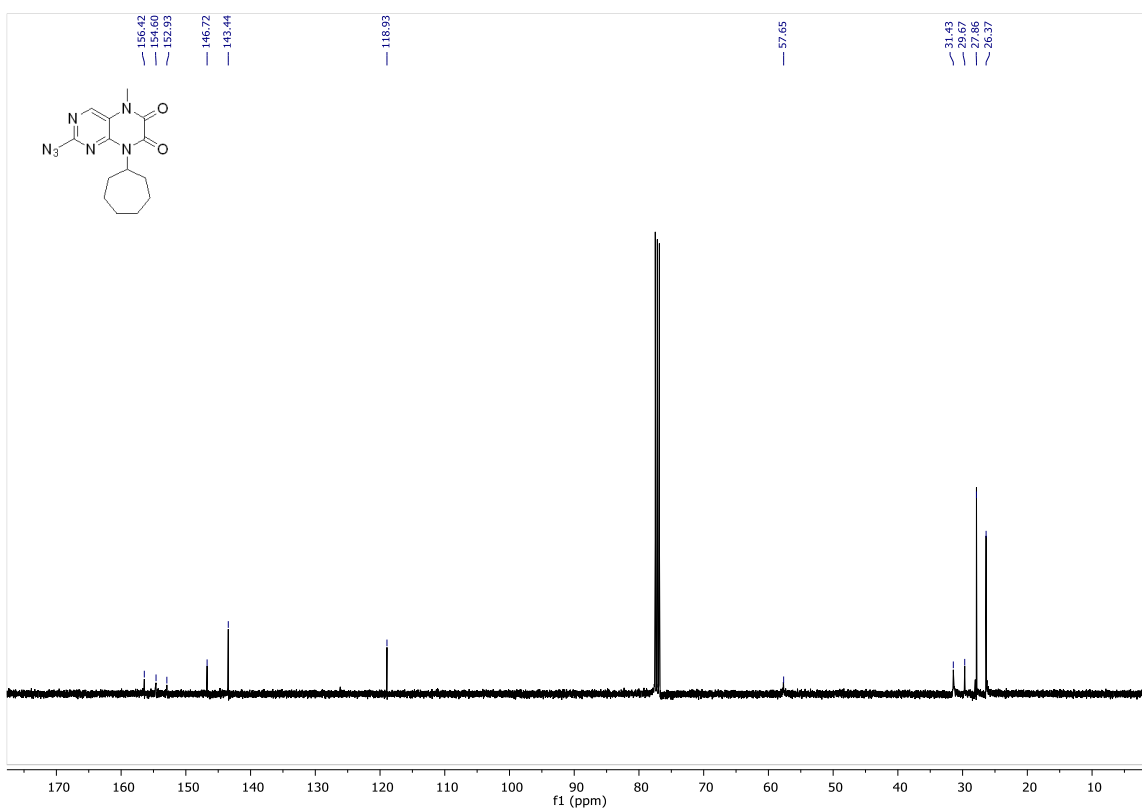
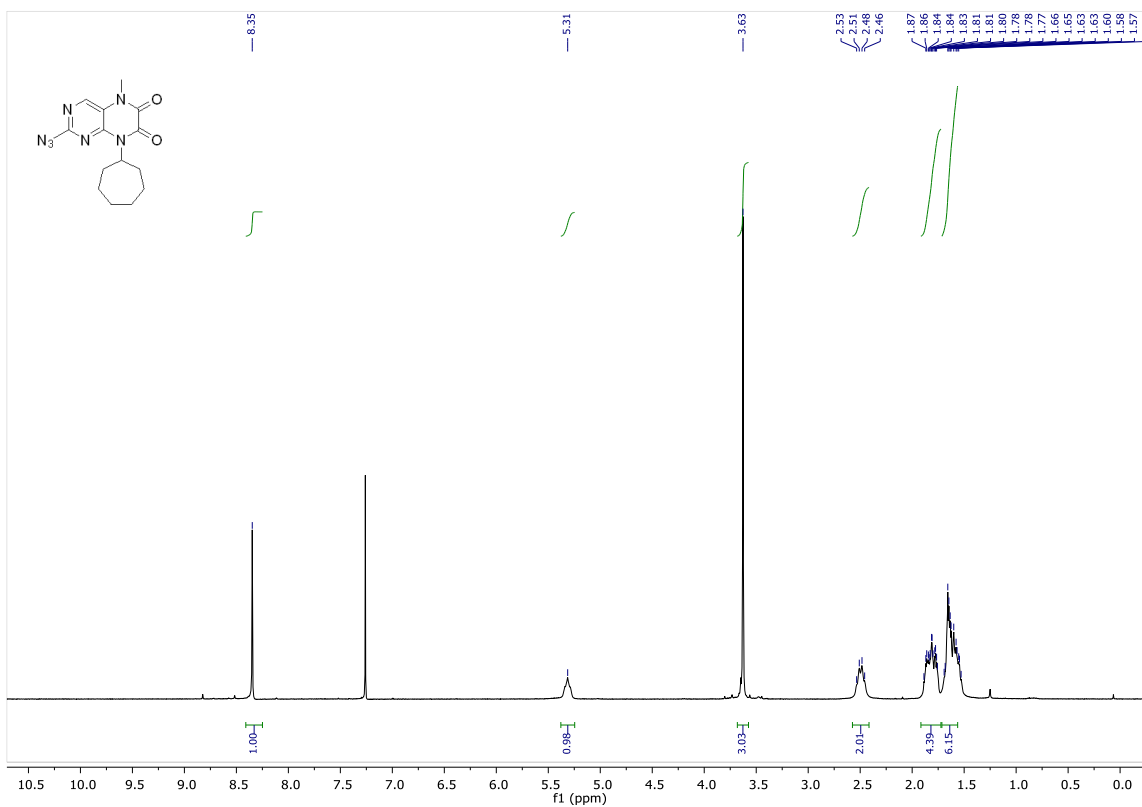
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 2-chlor-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (21)**



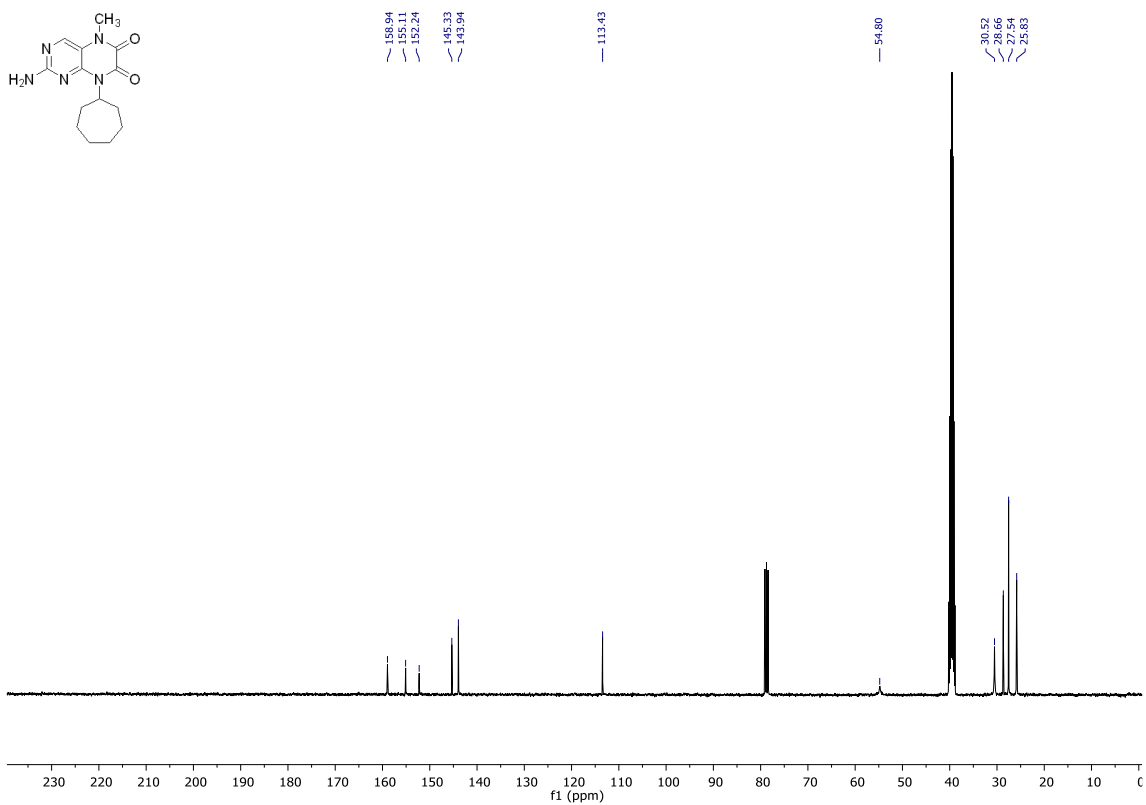
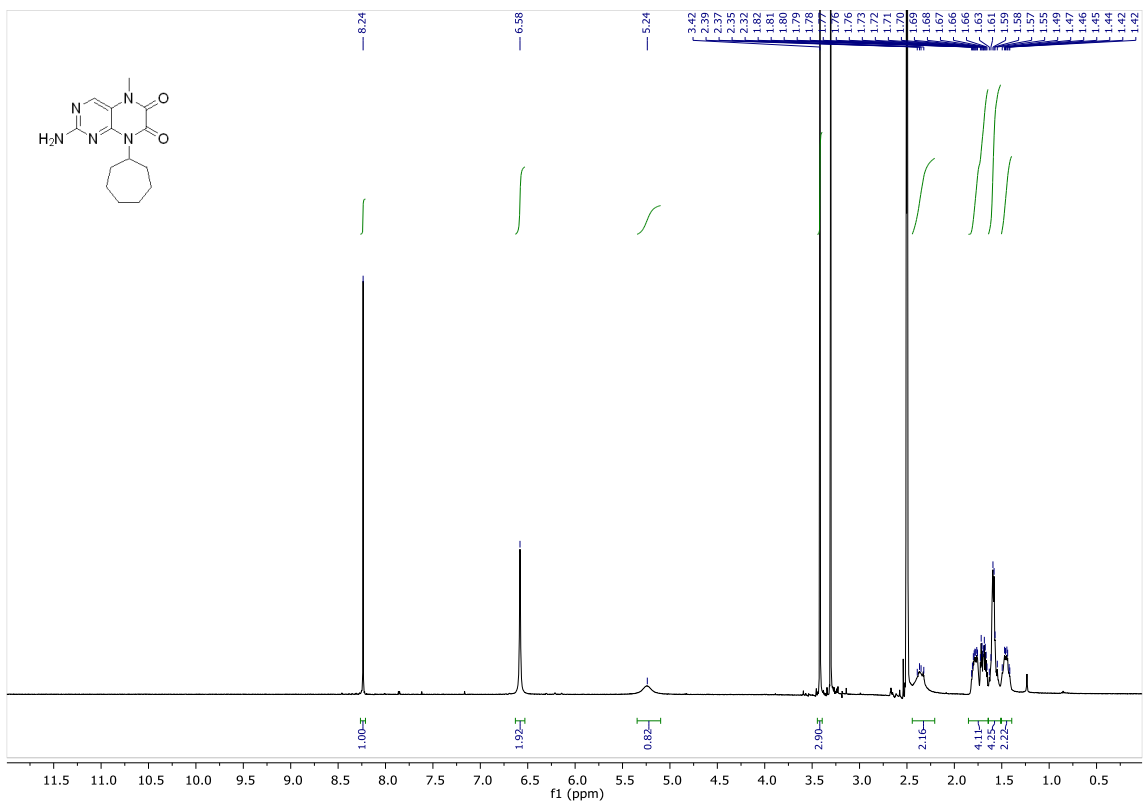
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 8-cykloheptyl-2-hydrazinyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (24)**



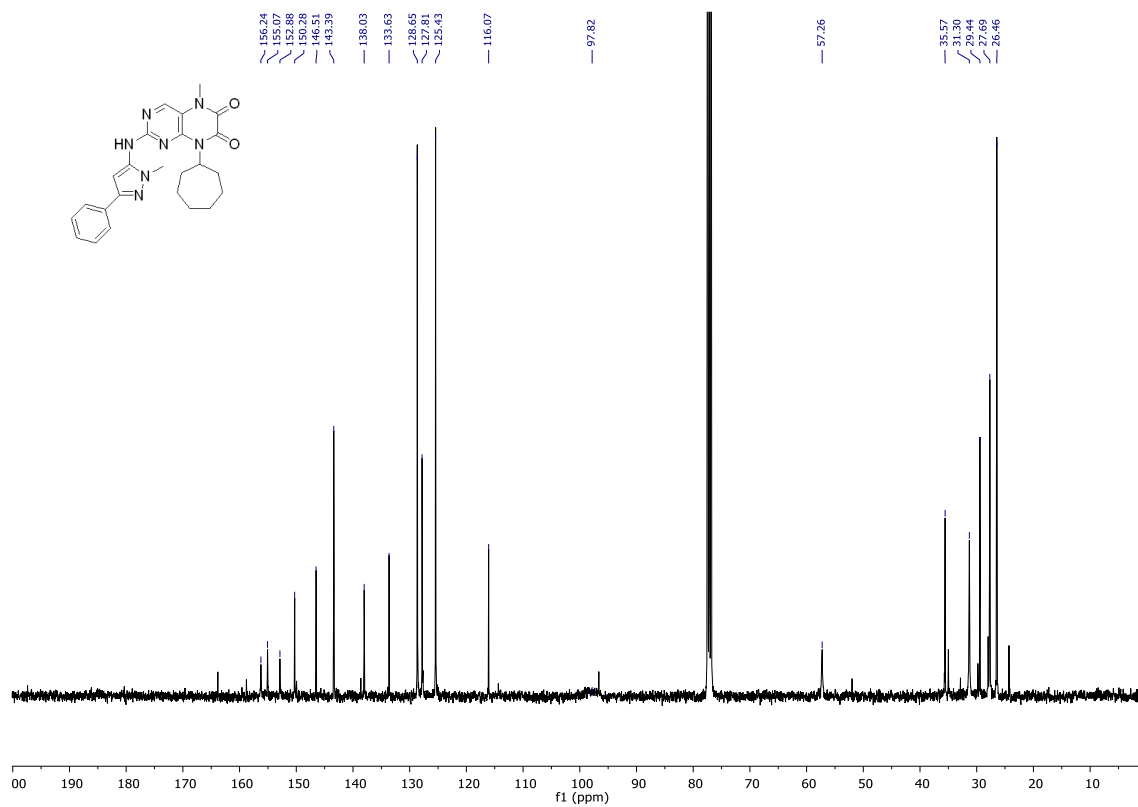
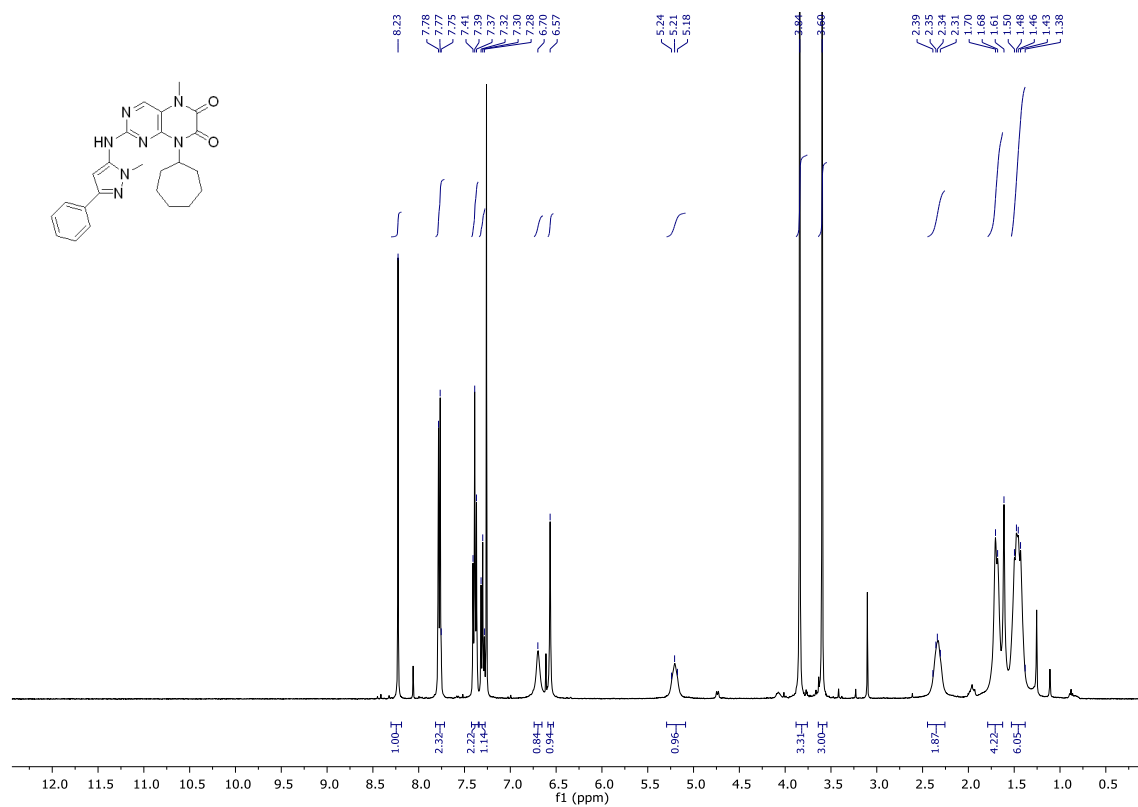
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 2-azido-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (22)**



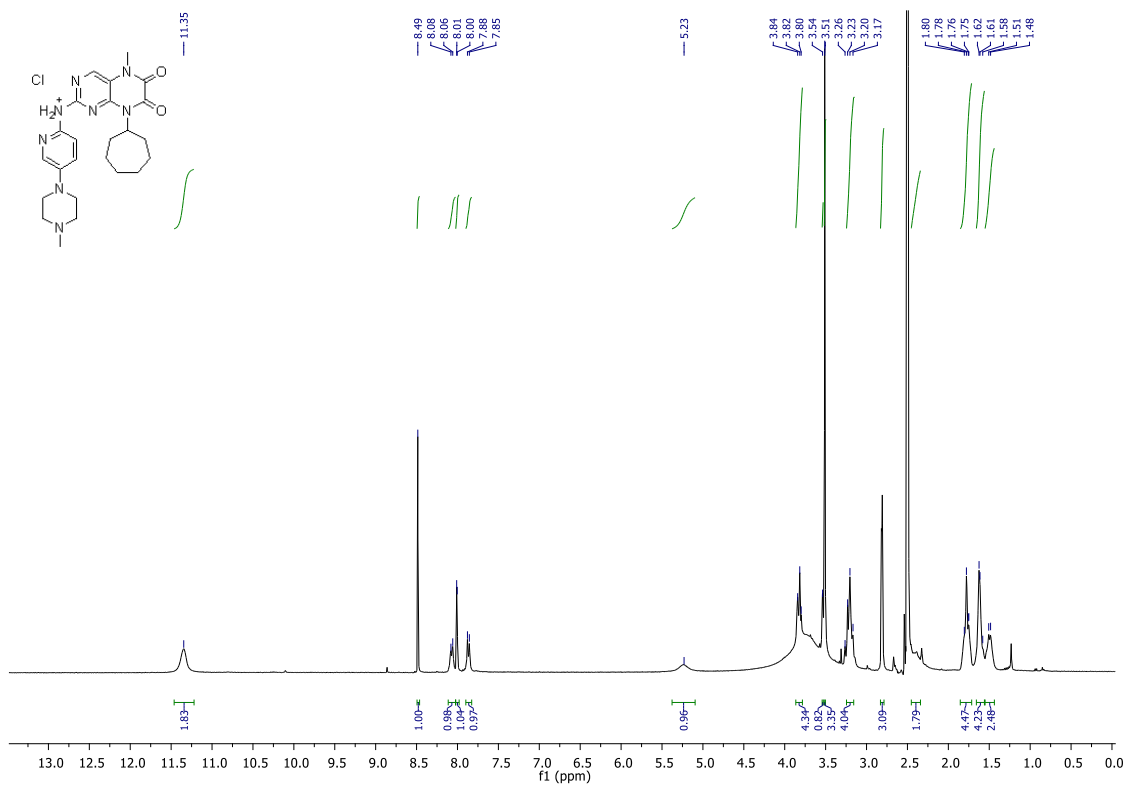
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 2-amino-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion  
(23)**



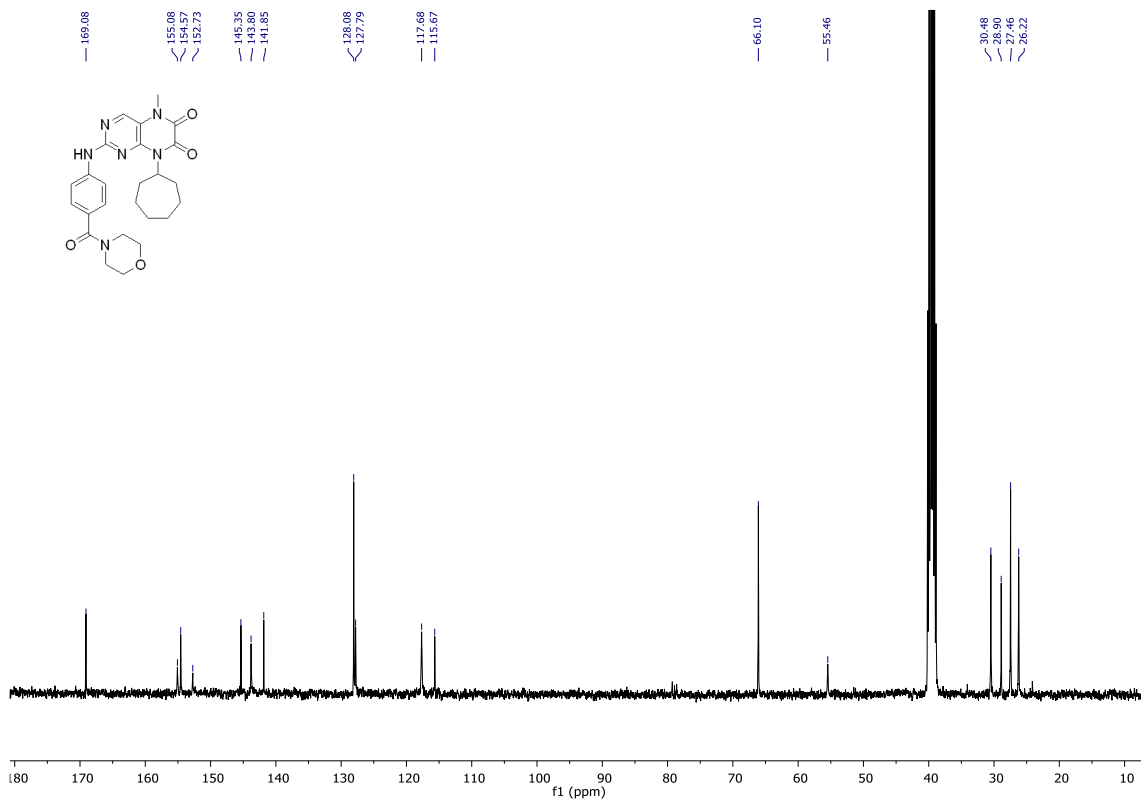
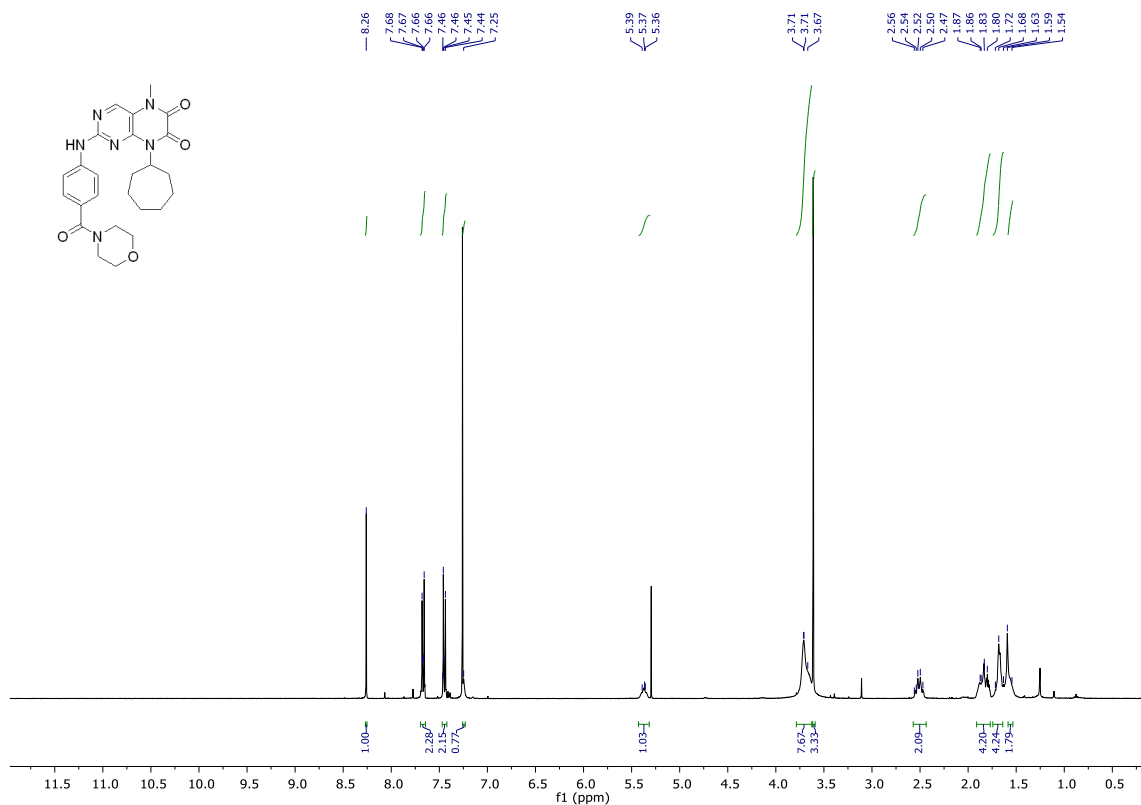
**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 8-cykloheptyl-5-methyl-2-((1-methyl-3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (34b)**



**<sup>1</sup>H spektrum 8-cykloheptyl-5-methyl-2-((5-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (34f)**



**$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrum 8-cykloheptyl-5-methyl-2-((4-(morfolino-4-karbonyl)fenyl)amino)-5,8-dihydropteridin-6,7-dion (34h)**





**<sup>1</sup>H spektrum 2-(4-(6-aminopyridin-3-yl)piperazin-1-yl)-8-cykloheptyl-5-methyl-5,8-dihydropteridin-6,7-dion** (37)

