

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



## **Studium syntézy nových derivátů 3,5,7-trisubstituovaného- pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu.**

### **Diplomová práce**

Autor:	<b>Bc. Růžena Padrtová</b>
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Forma studia:	prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.</b>
Rok:	2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s uvedením všech použitých informačních zdrojů a literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, dne 9.5.2018

.....

Podpis

### **Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za vstřícnost a trpělivost a při vedení mé diplomové práce, dále za cenné rady, kritické připomínky a odborné konzultace, které mi během řešení navržených cílů diplomové práce poskytoval. Poděkování patří také celému kolektivu Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, především RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D., Františku Škařupovi, Mgr. Kristýně Vlkové a Mgr. Vlastě Matuškové za cenné rady a připomínky při provedení experimentální části práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a trpělivost během mého magisterského studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Růžena Padrtová
Název práce:	Studium syntézy nových derivátů 3,5,7-trisubstituovaného-pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidinu.
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce:	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	<p>Tato diplomová práce je věnována studiu přípravy nových 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-<i>a</i>]pyrimidinů jako potenciálních kinázových inhibitorů. Teoretická část shrnuje literární rešerši o roli FLT3 kináz a několika strukturně odlišných i podobných typů FLT3 inhibitorů, se zaměřením na selektivitu a možné terapeutické využití. Dále na určité způsoby syntetických cest vedoucích k pyrazolo[1,5-<i>a</i>]pyrimidinovému skeletu, příklady biologicky aktivních derivátů tohoto typu látek a význam řešené problematiky ve vztahu k cílům diplomové práce. Experimentální část je soustředěna na devítistupňovou syntézu osmi nových a potenciálních 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-<i>a</i>]pyrimidinových CDK a FLT-3 inhibitorů, které jsou v poloze C5 substituovány 4-aminobutylamino, (<i>R</i>)-(1-ethyl-2-hydroxyethyl)-amino či 4-aminocyklohexylamino skupinou, v poloze C3 cyklopentylem a v poloze C7 řadou navržených amino-derivátů.</p>

Klíčová slova: FLT3 kinázy, inhibitory FLT3, 3,5,7-trisubstituované pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny, antiproliferační účinky, protinádorové účinky, selektivita, dinaciclib, cyklin-dependentní kinázy, CDK inhibitory

Počet stran: 102

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

## **Bibliographical identification:**

Author's first name

and surname:

Bc. Růžena Padrtová

Title:

The Study of Synthesis of Some New 3,5,7-Trisubstituted-Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Derivatives.

Type of thesis:

Master

Department:

Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural research, Department of Chemical Biology and Genetics

Supervisor:

RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

The year of presentation:

2018

Abstract:

This diploma thesis is devoted to the study of preparation of new 3,5,7-trisubstituted-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as potent kinase inhibitors. The theoretical part summarizes the literary research about the role of FLT3 kinases and several types of FLT3 inhibitors with different or similar structure core, with focus on selectivity, biological activity and possible therapeutic use. Further this part includes some synthetic pathways leading to the pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine skeleton, examples of biologically active compounds of this type of substances and the significance of the problem solved in relation to goals of this work. The experimental part is concentrated on the nine-steps synthesis of eight new and potential 3,5,7-trisubstituted-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine inhibitors of CDK and FLT3, with 4-aminobutylamino, (*R*)-(1-ethyl-2-hydroxyethyl)-amino and 4-

aminocyklohexylamino groups at C5-position, with cyclopentyl at the C3-position and series of proposed amino-derivatives at the C7-position.

Keywords: FLT3 kinases, FLT3 inhibitors, 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines, antiproliferative effects, antitumor effects, selectivity, dinaciclib, cyclin dependent kinases, CDK inhibitors

Number of pages: 102

Number of appendices: 0

Language: Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>4</b>
	<b>3.1 Biologický význam a funkce FLT3 kináz</b> .....	<b>4</b>
	3.1.1 Struktura FLT3 kinázy .....	4
	3.1.2 Funkce FLT3 kinázy .....	5
	3.1.3 AML a FLT3 mutace .....	6
	3.1.4 Inhibitory FLT3 kinázy .....	9
	<b>3.2 Syntetické přístupy k pyrazolo[1,5-<i>a</i>]pyrimidinovému skeletu</b> .....	<b>20</b>
	<b>3.2 Vybrané příklady biologicky aktivních pyrazolo[1,5-<i>a</i>]pyrimidinů</b> .....	<b>24</b>
	<b>3.3 Význam řešení problematiky ve vztahu k cílům diplomové práce</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>DOSAŽENÉ VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
	<b>4.1 Syntéza prekurzorů aminu</b> .....	<b>38</b>
	<b>4.2 Syntéza výchozích prekurzorů</b> .....	<b>39</b>
	<b>4.3 Syntéza klíčových prekurzorů</b> .....	<b>42</b>
	<b>4.4 Syntéza cílových prekurzorů</b> .....	<b>42</b>
	<b>4.4 Výsledky studia biologické aktivity syntetizovaných sloučenin</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>46</b>
	<b>5.1 Materiál a metody</b> .....	<b>46</b>
	<b>5.2 Syntéza prekurzorů aminu</b> .....	<b>48</b>
	5.2.1 Příprava 4-(3-nitrobenzyl)morfolinu (26) .....	48
	5.2.2 Příprava 3-(morfolinomethyl)anilinu (27) .....	48
	5.2.3 Příprava <i>N</i> -tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (29).....	49
	5.2.4 Příprava 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (30).....	50
	5.2.5 Příprava 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu (31).....	51
	5.2.6 Příprava 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)anilinu (32).....	52
	<b>5.3 Syntéza výchozích prekurzorů</b> .....	<b>53</b>
	5.3.1 Příprava 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny (41) .....	53
	5.3.2 Příprava 2-cyklopentylidenacetonitrilu (42). .....	54
	5.3.3 Příprava 2-cyklopentylacetonitrilu (43).....	55
	5.3.4 Příprava 2-cyklopentyl-3-oxopropannitrilu (44).....	56
	5.3.5 Příprava 4-cyklopentyl-1 <i>H</i> -pyrazol-3-aminu (45) .....	57
	5.3.6 Příprava 3-cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-3,5-(4 <i>H</i> ,6 <i>H</i> )-dionu (46) .....	58
	5.3.7 Příprava 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidinu (47) .....	60
	<b>5.4 Syntéza klíčových prekurzorů</b> .....	<b>61</b>
	5.4.1 Příprava <i>N</i> -(4-brobenzyl)-5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ] pyrimidin-7-aminu (48).....	61
	5.4.2 Příprava 5-chlor-3-cyklopentyl- <i>N</i> -(4- (morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-7-aminu (49).....	62
	5.4.3 Příprava 5-chlor-3-cyklopentyl- <i>N</i> -((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3- yl)methyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-7-aminu (50).....	63
	5.4.4 Příprava 5-chlor-3-cyklopentyl- <i>N</i> -(3- (morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-7-aminu (51).....	64
	5.4.5 Příprava <i>N</i> -(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-5-chlor-3- cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-7-aminu (52).....	65
	<b>5.5 Syntéza cílových prekurzorů</b> .....	<b>66</b>



5.5.1	Příprava $N^5$ -((1 <i>r</i> ,4 <i>r</i> )-4-aminocyklohexyl)- $N^7$ -(4-brombenzyl)-3-cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (53) .....	67
5.5.2	Příprava $N^5$ -((1 <i>r</i> ,4 <i>r</i> )-4-aminocyklohexyl)- $N^7$ -(4-morfolinomethyl)fenylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (54).....	68
5.5.3	Příprava $N^5$ -(4-aminobutyl)-3-cyklopentyl- $N^7$ -(4-morfolinomethyl)fenylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (55).....	69
5.5.4	Příprava $N^5$ -((1 <i>r</i> ,4 <i>r</i> )-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl- $N^7$ -((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (56).....	70
5.5.5	Příprava ( <i>R</i> )-2-((3-cyklopentyl-7-((6-thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)amino)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5-yl)amino)butan-1-olu (57). .....	71
5.5.6	Příprava $N^5$ -(4-aminobutyl)-3-cyklopentyl- $N^7$ -(3-morfolinomethyl)fenylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (58).....	73
5.5.7	Příprava $N^5$ -((1 <i>r</i> ,4 <i>r</i> )-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl- $N^7$ -(3-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (59) .....	74
5.5.8	Příprava $N^7$ -(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)- $N^5$ -((1 <i>r</i> ,4 <i>r</i> )-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentylpyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin-5,7-diaminu (60) .....	75
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>81</b>



# 1 Úvod

Akutní myeloidní leukémie (AML) je heterogenní porucha krvetvorné tkáně progenitorové buňky, která způsobuje abnormality, jež mají vliv na rovnováhu mezi proliferací buněk, jejich přežíváním, a také diferenciací [1]. Jedná se o nádorové onemocnění, jehož léčba v současnosti není dostačující. Nedávné pokroky v molekulární biologii však umožnily lépe pochopit biologii AML, což vedlo k objevu mnoha genů souvisejících s touto chorobou, včetně možných cílů pro její léčbu [2].

Mutace uvnitř genu FLT3 představují jednu z nejčastěji identifikovaných genetických změn, která narušuje intracelulární signální dráhy, jež mají důležitou úlohou v patogenezi leukémie. FLT3 (Fms – like tyrosin kinase) je členem III. třídy rodiny receptorových tyrosin-kináz, kam členíme i receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (PDGFR), receptor stimulující kolonie makrofágů (FMS) a faktor kmenových buněk (c-KIT). FLT3 s těmito receptory sdílí stejnou strukturu [3]. Po vazbě na extracelulární ligand se FLT3 dimerizuje, autofosforyluje a následně aktivuje sled signálních drah, včetně RAS/MAPK, JAK/STAT5 a PI3K/AKT. Tyto dráhy společně podporují růst, proliferaci, přežití a diferenciaci myeloidních buněk [4].

Nejběžnější skupinou mutací FLT3, nalezených u 23% všech pacientů s AML, jsou interní tandemové duplikace (ITD) s různou polohou i délkou. Zmíněné ITD mutace podporují na ligandu nezávislé dimerizace a jejich délka ovlivňuje prognózu [5]. U pacientů s delšími ITD mutacemi se projevily horší výsledky a nižší celkové přežití [6]. Poněkud časté jsou i „missense“ bodové mutace v tyrosi-kinázové doméně (TKD), které se vyskytují přibližně u 7% všech případů AML [3,4]. Tyto mutace stabilizují kinázu v aktivní konformaci a podporují její konstitutivní aktivaci [3].

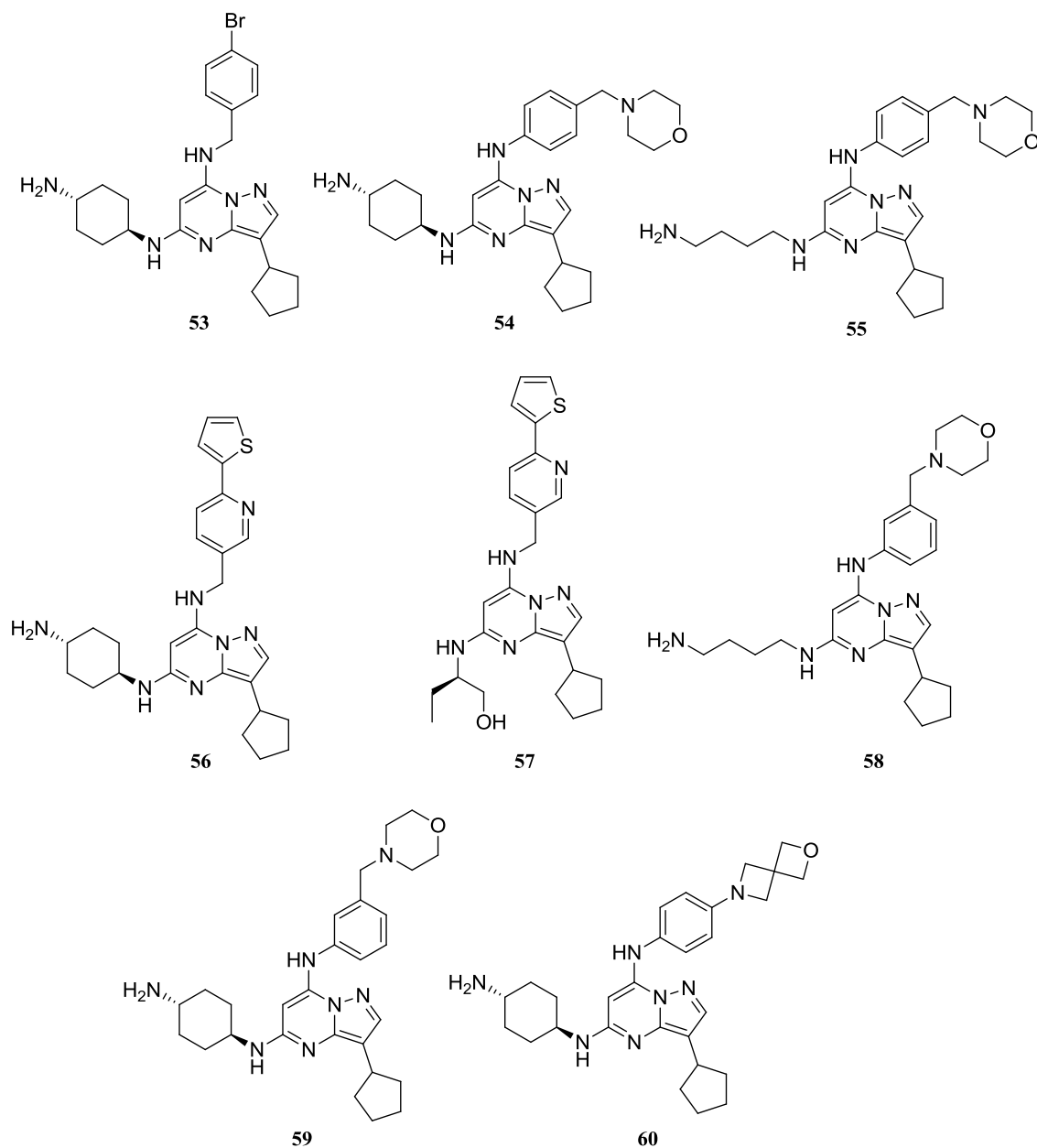
Mnoho studií naznačuje, že pacienti s mutací FLT3 mají horší prognózu než pacienti bez FLT3 kinázových změn. Zejména přítomnost FLT3-ITD koreluje se zvýšeným rizikem relapsu a s narušením celkového přežití pacientů [3]. Na základě těchto zjištění byl zahájen vývoj specifických inhibitorů FLT3 pro léčbu AML, z nichž jistá část byla podrobena klinickému testování [7,8,9]. První série inhibitorů, kam řadíme sunitinib, sorafenib či lestaurtinib, byla cílena nejprve obecně na tyrosin-kinázové receptory, až později byla zjištěna aktivita proti FLT3. Tyto inhibitory byly zprvu vyvinuty pro jiné indikace [8]. V preklinické studii byly velmi účinné, avšak v I. a II. fázi klinických zkoušek u pacientů s AML selhaly [4]. Hlavním problémem těchto

látek byla toxicita a omezená účinnost pravděpodobně kvůli jejich široké specifitě vůči receptorovým tyrosin-kinázám [8,9]. Proto byla iniciována příprava II. Generace specifitějších inhibitorů FLT3, která zahrnovala quizartinib, crenolanib, tandutinib a gilteritinib. Tyto sloučeniny potvrdily u pacientů s AML [8] významný počet úplných i částečných odpovědí. Často též vykazovaly aktivitu v buňkách AML, a také projevíly aktivitu na quizartinib-rezistentních AML buňkách se sekundárními FLT3 bodovými mutacemi [10,11].

Aberantně aktivovaná FLT3 kináza je v AML považována za atraktivní klíčový bod pro cílenou terapii. I přes to, že byla připravena již řada látek s pozitivními výsledky inhibice CDK i FLT3 kináz, je jejich rezistence vůči nádorovým buňkám stále vysoká. Tato skutečnost vybízí vědce k vývoji nových potenciálně účinných molekul v naději, že se podaří nesyntetizovat preparáty vedoucí k zásadnímu pokroku v léčbě tohoto závažného typu nádorového onemocnění [12].

## 2 Cíle práce

Cílem práce je syntéza vybraných nových duálních inhibitorů cyklin-dependentních a FLT3 kináz s pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinovým jádrem **53-60**. Práce zahrnuje vícestupňovou syntézu navržených látek, včetně klíčových prekurzorů, studium jejich struktury základními metodami organické strukturní analýzy a vyhodnocení základních biologických dat s návrhem případných dalších možností práce na tomto poli.



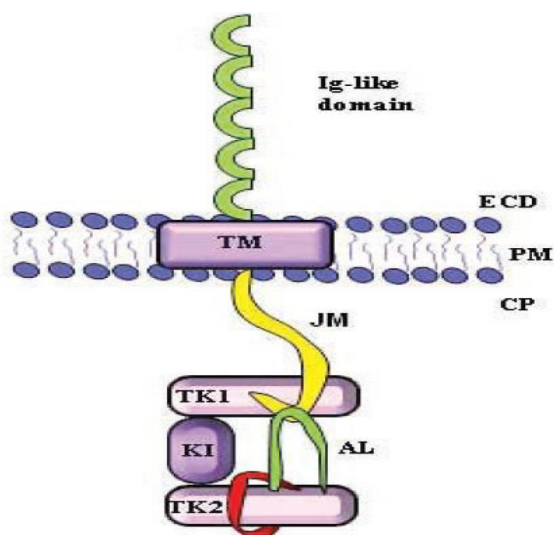
**Obr. 1:** Navržené cílové inhibitory 3,5,7-trisubstituovaného-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu.

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Biologický význam a funkce FLT3 kinázy

##### 3.1.1 Struktura FLT3 receptoru

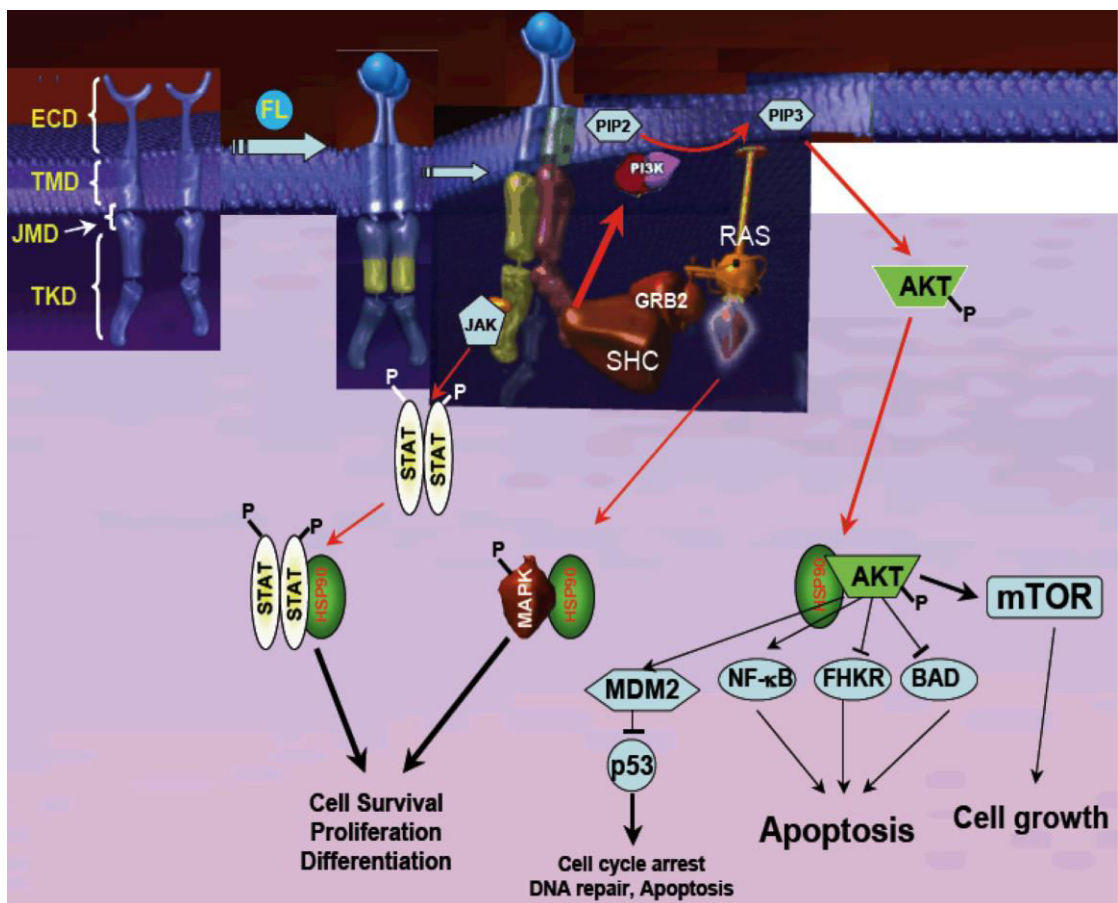
FLT3 receptor (Fms like tyrosin kinase 3), též známý jako FLK2 (fetální jaterní kináza), STK-1 (tyrosin kináza „z kmenových buněk“), nebo CD 135, je kódován genem FLT3. Tento gen se nachází na chromozomu 13g12 [13-14] a je složen z 24 exonů, pokrývajících přibližně 96 kilobází (kb). Jeho přesná velikost není známa kvůli přítomnosti velkého intronu (>50 kb), ležícího mezi exony 2 a 3 [15,16,17]. Délka transkriptu (přepisu) FLT3 genu, který zahrnuje pseudogen v otevřeném čtecím rámci 2979 párů bazí (pb), je 3,7 kb [15]. Onen kódovaný protein, tedy transmembránový receptor, obsahuje 933 aminokyselin s molekulovou hmotností 155-160 kDa a náleží do 3. třídy tyrosin-kinázové receptorové rodiny (RTK) [15,18]. Struktura receptoru sestává ze 4 oblastí: a) N-koncové extracelulární oblasti (541 aa) s pěti imunoglobulinovými doménami, z nichž 3 nejdlehlší od plazmatické membrány jsou zapojeny do vazby ligandu, zatímco zbylé proximální domény se podílejí na dimerizaci receptoru; b) transmembránové domény (21 aa); c) juxtamembránové domény (JM) a konečně d) intracelulární C-koncové oblasti (431 aa) se štěpící koncovou doménou. Interkinázovou doménu zároveň propojují dvě podstruktury: N-smyčka složená z tyrosin-kinázové domény 1 (TK1) a C-smyčka z tyrosin-kinázové domény 2 (TK2) (Obr. 2) [16,19]. Extracelulární vazba N-koncové oblasti je vysoce glykosylovaná a vykazuje vysokou afinitu k jejímu ligandu (ligand FLT3, či FL) [20]. Neglykosylovaná izoforma má molekulovou hmotnost 130-143 kDa a není propojená s plazmatickou membránou [21].



**Obr. 2:** Schematické znázornění FLT3 receptorového monomeru: Ig-like domain = imunoglobulinové domény, ECD = extracelulární doména (N-konec), TM = transmembránová doména, PM = plazmatická membrána, CP = cytoplazma, JM = juxtamembránová doména, KI = interkinázová doména, TK 1 = tyrosin-kinázová doména 1 (N-smyčka), TK2 = tyrosin-kinázová doména 2 (C-smyčka), AL = aktivační smyčka [12].

### 3.1.2 Funkce FLT3 receptoru

FLT3 je strukturně podobná receptorům FMS, c-KIT a PDGFR [3]. FLT3 je primárně exprimována na myeloidních a progenitorových buňkách, s proměnlivou expresí na zralých elementech monocytární linie. Mimo to byla popsána exprese FLT3 v lymfoidních hematopoetických orgánech, především v játrech, thymu, slezině a placentě [18,22,23]. Pokud je FLT3 receptor v nestimulovaném stavu, nachází se v monomerní, nefosforylované formě s inaktivní doménou. Po interakci s FLT ligandem (FL) dojde ke konformační změně, dimerizaci receptoru a aktivaci intracelulární tyrosin-kinázové domény (Obr. 3). Aktivovaný enzym rozpoutá kaskádovou fosforylaci v intracelulární doméně prostřednictvím řady cytoplazmatických proteinů (SHC proteinů, dále GAB2, GRB2, CBL, SHIP, atd.), což dává vznik komplexům s protein-proteinovými interakcemi. Díky tomuto procesu se zaktivují sekundární mediátoři, včetně MAPK, STAT a AKT/PI3K. Aktivovaní mediátoři jsou poté převedeni do jaderné interfáze s HSP90, z níž po sloučení s HSP90 vyšlou signál do jádra. Tento signál nakonec umožní v jádru buňky spustit sled životně důležitých funkcí, mezi které lze zařadit například buněčný růst, přežití buněk, diferenciaci, proliferaci, opravu DNA či apoptózu [23,24,25].



Obr. 3: Signální dráha FLT3: popis viz výše [23].

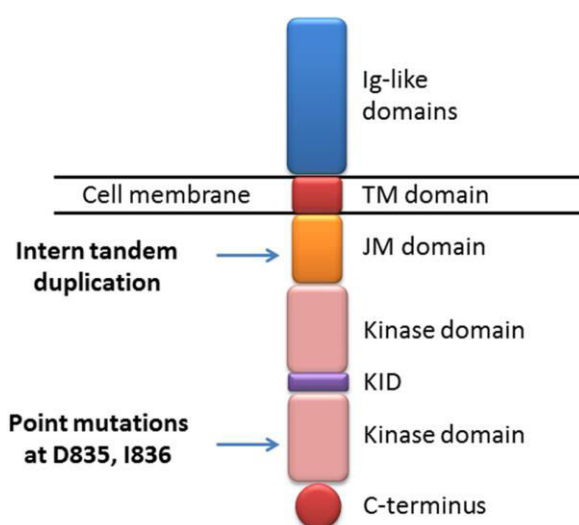
### 3.1.3 AML a FLT3 mutace

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní klonální onemocnění krvetvorby, které se vyvíjí z jediného klonu hematopoetické/progenitorové buňky. V AML byla pozorována přítomnost minimálně 2 druhů mutací [26,27,28]. Zmíněné abnormality spouští nekontrolovanou proliferaci, blokaci diferenciaci a potlačení apoptózy buněk, což ústí v akumulaci leukemických blastů v kostní dřeni [29]. V souvislosti s tímto závažným druhem onemocnění byla popsána řada genetických defektů, velmi často se jednalo o translokace směřující ke vzniku proteinů s aberantní funkcí a fúzních genů. K porozumění patologie AML u nemocných s normálním karyotypem (AML-NC) byl nutný objev dalších genových mutací s podporou buněčné proliferace (FLT3, RAS, c-KIT), dále mutací, které v genech umožní regulaci buněčného cyklu (p53, NPM1) a konečně genových mutací, důležitých pro myeloidní diferenciaci (CEPBA, RUNX1). K



nejvýznamějším prediktorům prognózy u AML s NC řadíme právě mutační status FLT3 genu [30].

Aktivní mutace FLT3 genu byly u AML identifikovány již v roce 1996 [5]. Nyní v AML představují nejfrekventovanější molekulární abnormality, díky čemuž se FLT3 stává vynikajícím terapeutickým cílem pro léčbu pacientů s tímto závažným typem onemocnění. Byly vyzorovány dva různé druhy FLT3 mutací: interní tandemová duplikace (ITD) a bodové mutace tyrosin-kinázové domény (TKD) (Obr.4) [31]. Jejich stručný popis je uveden níže.



**Obr. 4:** Struktura FLT3 genu se znázorněnými místy aktivace mutací. Interní tandemová

duplikace ležící v JM doméně v exonu 14 a bodové mutace v exonu 20 kinázové domény TK2 [31].

Nejčastější formou FLT3 mutace je ITD. Dochází k ní v juxtamembránové doméně a vyskytuje se přibližně u 20-30% pacientů s nově diagnostikovanou AML. Tyto mutace leží v exonu 14, mohou však zasahovat i do intronu 14 a exonu 15 [29,32]. FLT3-ITD je často spojována s délkou FLT3. Velikost duplikované části ITDs se může lišit od 3 bp až nad 400 bp, variabilní je i místo inserce. Výsledným ziskem je vždy transkript v *in frame* mutaci (tedy bez porušení či posunu čtecího rámce). Tento jev pak dává vznik funkčnímu proteinu, který ovšem vykazuje aberantní vlastnosti [32,19]. Protein, který je kódován libovolnou FLT3-ITD mutací, nevyžaduje pro svou aktivaci ligand [33,34]. Díky jeho mutaci dojde k narušení autoinhibiční konformace JM domény, což udržuje FLT3 kinázu stále v aktivní formě [19]. Během mutace FLT3-ITD

dochází nejprve k dimerizaci, následně je zahájena autofosforylace s konstitutivní aktivací, která má za následek sled po sobě jdoucích signálních drah, jež se podílejí na regulaci diferenciaci, proliferaci a buněčné smrti [33,34].

Přítomnost FLT3-ITD bývá obvykle propojena se zhoršenou prognózou onemocnění, kvůli vyššímu riziku relapsů, kratšímu celkovému přežití (OS) a zkrácené době přežití bez relapsu (RFS). Výsledky v závislosti na počtu různých ITD mutací, délce a lokaci jejich inserce na prognózu AML se prozatím liší [35,36]. U studie 354 pacientů s pozitivní FLT3-ITD mutací nebyla, v závislosti na počtu duplikovaných nukleotidů, potvrzena významná odlišnost v délce přežití, ani v incidenci relapsů. Slabá tendence mířící k jednoduššímu dovršení kompletní remise byla potvrzena pouze u pacientů s kratší duplikací [36,37]. V další studii 48 pozitivních FLT3-ITD pacientů s rostoucí délkou mutace byla zjištěna nižší pravděpodobnost dosažení CR, horší OS a kratší doba přežití bez relapsu [6,38]. Jiný výzkum věnovaný 18 nemocným se stejným typem FLT3 mutace, a taktéž s delší ITD, předchozí studii vyvrací s tvrzením delšího OS u těchto pacientů [39]. Aktuálnější zkoušky u pacientů se střední délkou mutace (48 až 60 bp) ukazují nejkratší RFS i OS, kdežto prognóza u nemocných s duplikací kratší než 48 bp či delší než 60 bp projevila lepší odezvu [36,40]. Bylo taktéž zjištěno, že se mimo délku duplikace ITD může u jednotlivých pacientů lišit i počet různých ITD, a to od 1, která je nejčastější, až po 4 odlišné [32,41]. Ačkoli Kottaridis et al. 2001 ve své publikaci tvrdí, že u nemocných s více různými mutacemi ITD je doba přežití kratší, jiné studované skupiny neprokázaly žádný vliv odlišného množství duplikací na průběh AML [36,37,38,41].

Rozšíření AML s FLT3-ITD mutací závisí na věku. U dětí trpících AML je nižší frekvence výskytu, naopak s narůstajícím věkem se pak objevuje častěji. Přítomnost FLT3-ITD mutací byla zjištěna nejen u AML, byla též potvrzena u akutní lymfoblastické leukémie, myelodysplastického syndromu a chronické myeloidní leukémie [23,5,42,43].

Méně časté jsou bodové mutace v polohách D835 a I836, ležící v TK2 doméně, tzv. FLT3-TKD mutace. Jejich výskyt je připisován přibližně 7 - 12% případů u AML [29,44]. Celkem bylo popsáno nejméně 6 forem mutací v D835 pozici a pouze jedna v I836 pozici. Tyto bodové mutace nesou označení „missense mutace“ díky tomu, že při mutaci D835 umožňují zaměnit aspartát za tyrosin (či jiné aminokyseliny) a při mutaci

I836 zaměnit izoleucin metioninem [33,45,46]. Vliv FLT3-TKD na prognózu onemocnění není tak jasný jako u FLT3-ITD. Je diskutabilní, zdali není za tuto skutečnost zodpovědný právě nízký výskyt těchto bodových mutací. Jisté studie prokázaly zhoršenou prognózu [45,47,48], další naopak projevíly slabý, nebo téměř žádný dopad TKD mutací na OS pacientů s AML [36,46,49,50].

### **3.1.4 Inhibitory FLT3 kináz, strukturní typy, selektivita, terapeutický potenciál**

Aktivovaná FLT3 kináza má schopnost ovlivnit diferenciační a proliferační aktivitu krvetvorných buněk, a také může mít vliv na další buněčné dráhy. U nemocných s AML, kde je potvrzena mutace FLT3, probíhá spontánní aktivace FLT3. Právě možnost blokáce signální dráhy FLT3 se jeví jako vhodný terapeutický cíl. Vyhovujícím prostředkem k tlumení aktivity FLT3 jsou inhibitory tyrosin kináz (TKI), které inhibují přímo intracelulární tyrosin-kinázové úseky. Zahájením *in vitro* testů u nespecifických TK inhibitorů, např. AG1295, herbimycin, AG1296, bylo zjištěno, že právě tyto látky tlumí aktivitu FLT3/ITD, čímž vyvolají apoptózu u buněk s touto FLT3 mutací [43,51]. Pokračující studie pak vedly k vývoji mnoha dalších TKI (SU5416, SU5614, SU11248, PKC412, MLN518, CEP-701 a CEP-5214), jež vykazují stejnou funkci [52,53,54,55,56]. Řada již zmíněných TKI je efektivní v léčbě několika druhů rakoviny, včetně nemalobuněčného karcinomu plic, chromické myeloidní leukémie (CML), akutní myeloidní leukémie (AML), myelofibrózy, karcinomu renálních buněk, melanomu, gastrointestinálního stromálního nádoru, hepatocelulárního karcinomu a sarkomu [57]. Dosud byly publikovány odezvy klinických zkoušek např. u sunitinibu (SU11248), midostaurinu (PKC412), lestaurtinibu (CEP-701) a tandutinubu (MLN518) [52,53,54,55,56]. Všechny tyto látky byly zkoušeny v terapii u nemocných s chemorezistentní, či relabující AML, u nichž byla léčba obvykle dobře snášena. Dále byla citována i inhibice FLT3 fosforylace. U zhruba poloviny z těchto pacientů byla prokázána redukce cirkulujících blastů v kostní dřeni i v periferní krvi, avšak s krátkodobou účinností (cca několik týdnů). Na základě předchozích nepříliš pozitivních výsledků byla zkoušena i kombinovaná léčba TKI s chemoterapií, u níž vědci předpokládali podobný účinek. Některé studie s kombinovanou terapií předběžně prokázaly poměrně vysoké procento kompletní remise (CR), u zbylých se na výsledky teprve čeká [43,59,60]. Dodnes byla vyvinuta řada TKI s inhibicí FLT3 a díky svým

výjimečným vlastnostem rozvoj těchto malých a velmi efektivních molekul trvá i nadále s nadějí zisku dalších léků s kladnou odezvou na výše uvedené a třeba i jiné druhy onemocnění [31]. Pro zajímavost jsem uvedla podrobnější popis k některým z nich.

Inhibitory FLT3 kináz (FLT3i) lze klasifikovat dle mechanismu interakce s receptory na inhibitory I. a II. typu a též podle specifity k FLT3 na 1. a 2. Generaci.

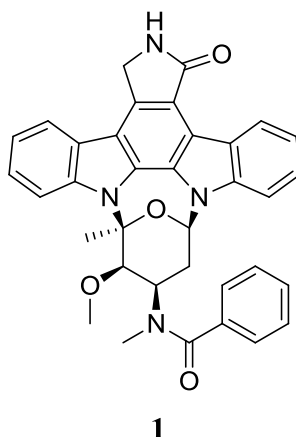
### ***Inhibitory typu I a II***

Inhibitory typu I a II jsou FLT3 inhibitory s klasifikací určenou na základě jejich mechanismu interakce s receptory [61]. Po aktivaci prochází FLT3 konformační změnou zahrnující přeskupení tří zbytků, konkrétně Asp-Phe-Gly (D-F-G). Aktivní a neaktivní konformace se pak nazývají DFG-in a DFG-out. Všechny inhibitory FLT3 interagují s ATP-vazebným místem intracelulární TKD a kompetitivně inhibují vazbu ATP, čímž zabraňují autofosforylaci receptorů a aktivaci proudu signalizací. Když je receptor aktivní, inhibitory typu I se váží na ATP-vazebné místo. Naopak inhibitory typu II interagují s hydrofobní částí bezprostředně sousedící s ATP-vazebným místem, která je přístupná pouze tehdy, pokud je receptor v neaktivní konformaci a brání aktivaci receptoru. Nejčastějším místem mutací TKD je mutace D835, která podporuje aktivní konformaci receptoru. Díky tomu inhibitory typu I blokují signalizaci FLT3 v buňkách u pacientů trpících AML s mutacemi ITD či TKD, zatímco inhibitory typu II blokují pouze FLT3 s ITD mutací, nikoli s TKD, i když některé mutace D835 zachovávají citlivost [62]. Důležité však je, že vývoj mutací D835 v buňkách s ITD je mechanismem získané nebo sekundární rezistence vůči inhibitorům FLT3 typu II [63]. Do skupiny inhibitorů typu I lze zahrnout sunitinib, lestaurtinib, midostaurin, crenolanib a gilteritinib. Inhibitory typu II naopak reprezentuje například sorafenib, quizartinib a ponatinib [64].

### ***Stručný přehled vybraných FLT3 inhibitorů – 1. Generace***

Inhibitory první generace, včetně sunitinibu, sorafenibu, midostaurinu, lestaurtinibu a tandutinibu, postrádají specifitu pro FLT3. Inhibice více RTK může zvýšit účinnost proti leukemii tím, že inhibuje cíle podél FLT3, a to buď v paralelních signálních drahách, nebo blokuje jiné cíle v buňkách AML. Nicméně, aktivity mimo cíl bohužel způsobují toxické účinky [64]

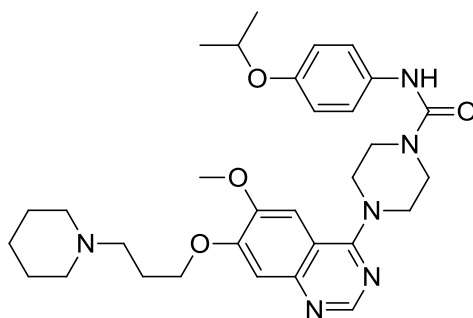
**Midostaurin**, čili **PK412** (Obr. 5), se na trhu objevuje pod názvem Rydapt [65] a vyvinula jej společnost Novartis Pharma AG. Jde o multi-cílený indokarbazolový inhibitor typu I, který byl zkoumán v léčbě akutní myeloidní leukémie (AML), myelodysplastického syndromu (MDS) a pokročilé systémové mastocytózy. Tato látka, strukturně podobná staurosporinu, se zprvu jevila jako inhibitor protein-kinázy C (PKC), posléze u ní byla zjištěna i inhibiční aktivita FLT3, VEGFR, PDGFR a c-KIT. Právě u FLT3 kináz se projevila jako širokospektrální a orálně biologicky dostupný inhibitor, který se nachází již v pozdních fázích klinického testování. V preklinických studiích zprostředkoval Midostaurin nejen zastavení buněčného cyklu, indukoval i apoptózu v mutovaných FLT3-pozitivních buňkách, a to inhibicí aktivity FLT3 kináz v buňkách Ba/F3-FLT3-ITD s hodnotou  $IC_{50}$  přibližně 0,01  $\mu$ M a blokadí fosforylace FLT3-ITD s  $IC_{50} = 30$  nM (Tab. 1) [66]. V I.-b fázi klinického testování byli nově diagnostikovaní pacienti s AML léčeni pomocí PK412 v souběžných a sekvenčních kombinacích indukovaných s daunorubicinem a cytarabinem + konsolidací vysokými dávkami cytarabinu. To vedlo k úplné remisi u 100% pacientů s pozitivní FLT3 mutací, u nichž byly pozorovány přechodné, či reverzibilní vedlejší účinky [67]. Ve II. fázi těchto zkoušek byl midostaurin obecně dobře snášen s redukováným počtem periferních blastů, což bylo pozorováno přibližně u třetiny pacientů s relapsy/refrakterní AML léčených právě touto látkou, se střední dobou odezvy – 13 týdnů [53,68]. Úroveň hematologické odezvy u nemocných s pokročilou AML, léčených PK412, byla podobná jako u pacientů s CML blastickou krizí, kteří dostávali Imatinib [69]. V nedávno popsané studii III. fáze byl midostaurin kombinován se standardní chemoterapií, což vedlo k významnému zlepšení celkového přežití (OS) a přežití pacientů bez příhod (EFS). Tato skutečnost naznačuje možné podání tohoto preparátu pacientům mladšího věku s AML [70].



Midostaurin (PKC412/Novartis)

**Obr. 5:** *Struktura Midostaurinu* [103].

Dalším neméně důležitým inhibítozem II. typu, cíleným na FLT3, c-KIT a PDGFR s inhibicí autofosforylace FLT3-ITD  $\sim 200$  nM (Tab. 1), je piperazinyl chinazolinový derivát – **tandutinib** (MLN518, či **CT53518**) (Obr. 6), který byl vyvinut biofarmaceutickou společností Millenium Pharmaceuticals [71]. MLN518 byl testován v časných klinických studiích u pacientů s recidivující, či refrakterní AML. I. fáze klinických zkoušek byla zaměřena na testování bezpečnosti a tolerance perorálních dávek této látky u nemocných trpících AML, mimo to byl tandutinib podroben testování v kombinaci se standardní indukční chemoterapií pro terapii pacientů s nově diagnostikovanou AML. Co se týče výsledků MLN518 vykazoval jako jediný zástupce omezenou aktivitu proti AML a myelodysplastickému syndromu, nicméně když byl u nemocných s nově diagnostikovanou AML podáván společně s cytarabinem a daunorubicinem [72], bylo dosaženo 90% kompletní remise. U pacientů s nově diagnostikovanou AML, kteří se po uvážení zdáli jako nevhodní pro léčbu tímto přípravkem, nebo přímo odmítli podstoupit standardní indukční terapii, byl preparát MLN518 před zahájením II. fáze klinického testování stažen. Tandutinib se momentálně nachází ve II. fázi klinických zkoušek proti progresivním prostatickým a kostním metastázám a glioblastomu. Byla též dokončena II. fáze studií MLN518 u pacientů s metastazujícím renálním karcinomem a probíhá I. a II. fáze testování, kde je zmíněný preparát zkoušen proti recidivujícímu, či progresivnímu glioblastomu. Tandutinib se také nachází v kombinaci s bevacizumabem ve II. fázi testování pro léčbu nemocných s vysokým stupněm recidivujících glyomů [69].

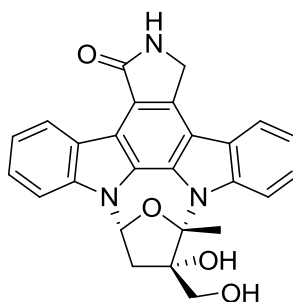


2

Tandutinib (MLN518,CT5318/Millennium)

**Obr. 6:** *Struktura Tandutinibu* [103].

Významným inhibitorem FLT3 kináz je i indokarbazolový alkaloid **Lestaurtinib**, neboli **CEP-701** (Obr. 7), vyrobený biofarmaceutickou společností Cephalon. CEP-701 je inhibitorem typu I, který blokuje růst buněk Ba/F3 - FLT3-ITD s  $IC_{50} = 5$  nM a inhibuje fosforylaci FLT3-ITD s hodnotou  $IC_{50} = 3$  nM (Tab. 1). Dalšími proteinovými cíly pro tuto látku jsou mimo FLT3 kinázy i TrkA a VEGFR [73]. V počáteční fázi klinických studií vykazovali pacienti s recidivující nebo refrakterní AML na tuto látku krátkodobé klinické odezvy [74,75]. U několika pacientů byla potvrzena kompletní inhibice autofosforylace FLT3 bez souběžné klinické odpovědi, zatímco u části dalších se ukázal pokles periferních leukemických blastů na <5%. Ve II. fázi klinických zkoušek pro starší pacienty trpící AML, kteří nebyli považováni za vhodné kandidáty pro intenzivní léčbu chemoterapií, byly zjištěny přechodné klinické odpovědi [76]. Nedávno byla ukončena studie III. fáze u nemocných s recidivující AML s mutantní FLT3, která byla původně zahájena jako studie II. fáze. Mimo to pokračuje III. fáze klinického testování ve Spojeném království Velké Británie a Severního Irsku, zkoumající účinky chemoterapie společně s přípravkem CEP-701, kde se účastní jak pacienti s mutantní, tak i nemutantní FLT3. Lestaurtinib byl také testován v I. fázi klinických zkoušek u pacientů s vysoce rizikovým neuroblastomem a ve II. fázi klinických studií na léčbu rakoviny prostaty [69].



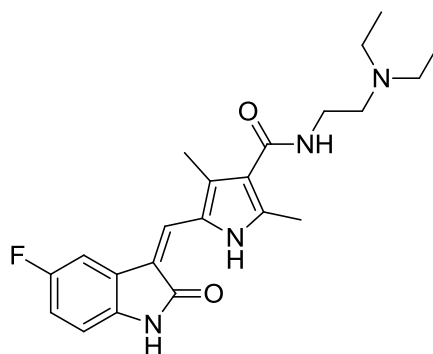
3

Lestaurtinib (CEP-701/Cephalon)

**Obr. 7:** *Struktura Lestaurtinibu* [103].

Indolinonový derivát **Sunitinib**, též značený **SU112448** (Obr. 8) a prodáváný jako přípravek SUTENT od společnosti Pfizer [77], je perorálně podávaným inhibitorem I. typu řady receptorových kináz, které vykazují protinádorovou a antiangiogenní aktivitu na mnoha *in vivo* a *in vitro* modelech [78]. Preparát SU11248 blokuje mutované formy FLT3 kináz, konkrétně FLT3-ITD a FLT3-D835Y [77], se stejnou účinností - např. růst buněk MV11-4 tlumí s hodnotou  $IC_{50} = 10$  nM (Tab. 1) [79]. Kromě FLT3 se potvrdila inhibiční schopnost této látky i u PDGFR, c-KIT, VEGFR1, receptory kolonie stimulujícího faktoru (CSF-1R) a receptory pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET, glial cell – line derived neurotrophic factor receptor) [80]. V I. fázi klinického testování Sunitinib v monoterapii AML vedl k částečné či úplné morfologické remisi u všech 4 pacientů s FLT3-ITD, nicméně, remise byla krátká a u nemocných se projevila významná toxicita [81]. V následující I/II fázi klinických studií se projevila okamžitá kompletní remise u 59% starších pacientů s FLT3 mutací [82]. V současnosti se Sunitinib používá především k léčbě renálního karcinomu ledvin, neuroendokrinních nádorů a pokud nezabírá léčba Imatinibem, tak i k terapii gastrointestinálních stromálních tumorů [83].



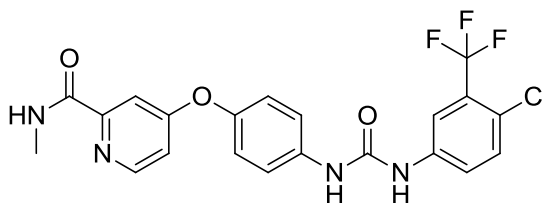


4

Sunitinib (SU11248, SUTENT/Pfizer)

**Obr. 8:** *Struktura Sunitinibu* [103].

Biaryl-močovinný derivát – **Sorafenib**, též **BAY43-9006** (Obr. 9), či přípravek s označením **Nexavar** od firmy Bayer, byl zprvu vyvinut jako RAF inhibitor, který projevils svou aktivitu proti VEGFR, PDGFR a c-KIT. Posléze byla u Sorafenibu, tedy inhibitoru typu II, zjištěna aktivita i proti FLT3 (konkrétně FLT3-ITD a D835G) [84,85,86], kde fosforylaci FLT3-ITD inhibuje s hodnotami  $IC_{50} = 2,8$  nM a růst buněk MV4-11 s  $IC_{50} = 0,88$  nM (Tab. 1) [86]. Co se týče klinických studií, byla tato látka testována v I. fázi u pacientů s refrakterní nebo relapsovou AML, což se u nemocných s AML pozitivní na FLT3-ITD projevilo snížením procenta výskytu leukémie v kostní dřeni [84]. Tento preparát byl následně schválen FDA pro léčbu pokročilého karcinomu ledvin (2005), hematocelulárního karcinomu (2007) a karcinomu štítné žlázy (2013). Momentálně se tato substance nachází v klinickém hodnocení pro gastrointestinální stromální nádory (GIST) rezistentní na imatinib a sunitinib [69].



5

Sorafenib (BAY43-9006/Bayer)

**Obr. 9:** *Struktura Sorafenibu* [103].

**Tabulka 1:** *Cytotoxicita vybraných buněčných linií a inhibiční aktivita fosforylace FLT3-ITD*

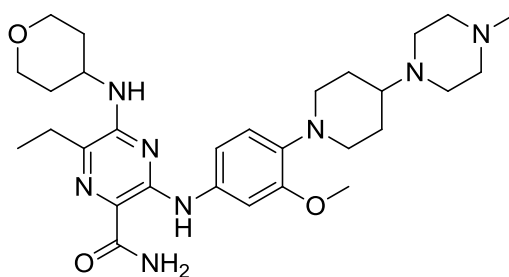
*u FLT3 inhibitorů 1. Generace [66,71,73,79,86].*

Zkoušené léčivo	číslo	Ba/F3-FLT3-ITD IC <sub>50</sub>	MV4-11-FLT3-ITD IC <sub>50</sub>	fosforylace FLT3-ITD IC <sub>50</sub>
Midostaurin	1	0,01 μM	-	30 nM
Tandutinib	2	-	-	~ 200 nM
Lestaurtinib	3	5 nM	-	3 nM
Sunitinib	4	-	10 nM	-
Sorafenib	5	-	0,88 nM	2,8 nM

### ***Stručný přehled vybraných FLT3 inhibitorů – 2. Generace***

Naproti tomu inhibitory FLT3 druhé generace, získané racionálním vývojem léků, jsou specifitější, účinnější a mají taktéž méně toxických účinků spojených s nepříznivými vlivy. Ovšem, inhibitory FLT3 druhé generace většinou směřují pouze k FLT3 a nevykazují aktivitu proti cílům podél FLT3, a to buď v již výše zmíněných paralelních signálních dráhách, či v buňkách AML. Inhibitory druhé generace quizartinib, crenolanib a gilteritinib a další níže uvedené se momentálně nachází v klinických studiích [64].

**Giltertinib**, pyrazinkarboxamidový derivát se zkratkou **ASP2215** (Obr. 10), je selektivní, účinný a aktivní proti různým typům pozitivních FLT3 mutací [87]. Tato malá molekula se řadí mezi FLT3 inhibitory I. typu (Tab. 2) [88]. V I a II. fázi klinického testování ASP2215 byla u 46% pacientů, bez ohledu na stav FLT3 mutace, pozorována kompletní remise. Důležité je, že 29% pacientů s FLT3/TKD mutací dosáhlo úplné remise [89,90]. V současné době probíhají klinické studie giltertinibu v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky [91].

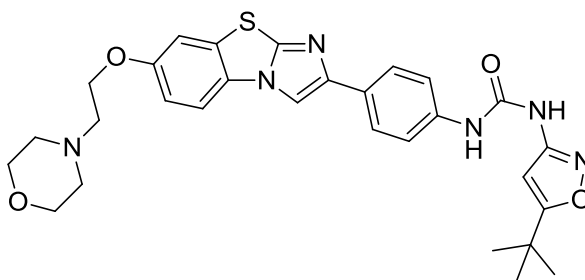


6

Giltertinib (ASP2215)

**Obr. 10:** *Struktura Giltertinibu* [103].

Látka s označením **AC220**, neboli **quizartinib** (Obr. 11), byl specificky navržen jako FLT3 inhibitor s vysokou účinností a selektivitou (Tab. 2) [92]. Pozitivní klinická odpověď byla pozorována již v I. fázi klinických zkoušek u 30% pacientů, a to bez ohledu na typ FLT3 mutace [93]. Klinická odezva se týkala 53% pacientů s FLT3-ITD a 14% pacientů s FLT3-WT mutací. Navíc, úplná inhibice FLT3-ITD byla pozorována na základě *in vitro* plazmatických inhibičních testů. Následovala II. fáze klinického testování AC220 za účasti 333 pacientů, kde 44% pacientů s FLT3-ITD a 34% pacientů s FLT3-WT dosáhli CR [94]. Nyní probíhá III. fáze klinických studií s označením Quantum, v níž je quizartinib hodnocen jak v monoterapii, tak i společně se standardní indukční chemoterapií [95].



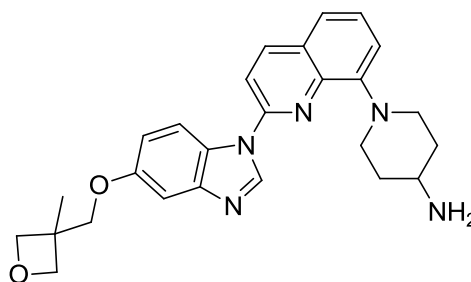
7

Quizartinib (ACP220/Amibt)

**Obr. 11:** *Struktura Quizartinibu* [103].

**Crenolanib** (též **CP-868-596**) (Obr. 12) byl zprvu vyvinut jako inhibitor PDGFR, posléze i jako FLT3 inhibitor druhé generace, ovšem I. typu. CP-868-596 potvrdil

silnou cytotoxicitou vůči buněčným leukemickým liniím nesoucím mutace FLT3-ITD nebo FLT3 D835 (Tab. 2) [96]. Ve II. fázi klinických studií u pacientů s recidivující či refrakterní AML prokázal Crenolanib vyšší aktivitu u nemocných, kteří nebyli dosud léčeni FLT3 inhibitory [97]. Současná studie NCT02283177 se zaměřuje na kombinaci této látky s indukčními chemoterapeutiky u pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním AML s FLT3-ITD nebo TKD mutacemi [98].

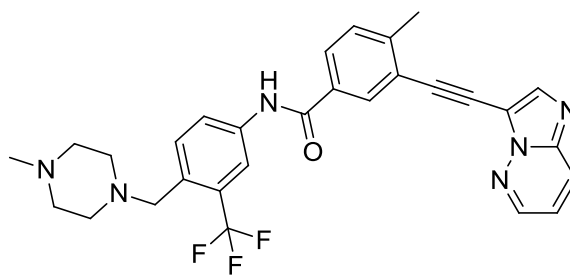


8

Crenolanib (CP-868,596/AROG Pharmaceuticals)

**Obr. 12:** *Struktura Crenolanibu* [103].

**Ponatinib**, neboli **AP23534** (Obr. 13), je FLT3 inhibítozem II. typu, který vykazuje inhibiční aktivitu i u BCR-ABL. Tento lék byl vyvinut firmou Ariad a používá se pod obchodním názvem Iclusig. AP23534 projevil již v preklinických studiích silnou cytotoxicitu proti leukemickým buňkám s FLT3-ITD a v menší míře i s FLT3-TKD mutacemi (Tab. 2) [99]. Na základě těchto výsledků byly provedeny I. a II. fáze klinického testování, hodnotící bezpečnost a účinnost tohoto léku v kombinaci s konsolidací cytarabinu u nemocných s ITD mladších 70 let (NCT02428543), a také s či bez azacitidinu u neléčených pacientů trpících AML s FLT3-ITD, kteří nebyli schopni podstoupit chemoterapii (NCT02829840) [64].

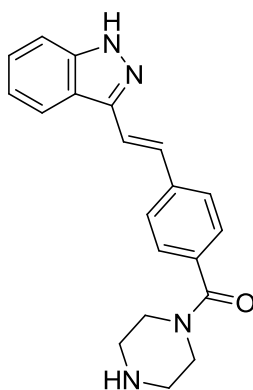


**9**

Ponatinib (AP24534, ICLUSIG/Ariad)

**Obr. 13:** *Struktura Ponatinibu* [103].

**KW-2449** (Obr. 14), multikinázový inhibitor FLT3 (Tab. 2), ABL, Aurora kinázy a c-KIT [100], je studován v léčbě pacientů s leukémií. V I. fázi klinických zkoušek KW-2449 umožnil pokles periferních blastů [101,102]. KW-2449 byl též nedávno zařazen do II. fáze klinického hodnocení u FLT3-pozitivní AML [69].



**10**

KW-2449 (Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd)

**Obr. 14:** *Struktura KW-2449* [103].

**Tabulka 2:** *Hodnoty IC<sub>50</sub> FLT3-ITD a D835Y u vybraných FLT3 inhibitorů 2. Generace* [87,104,105].

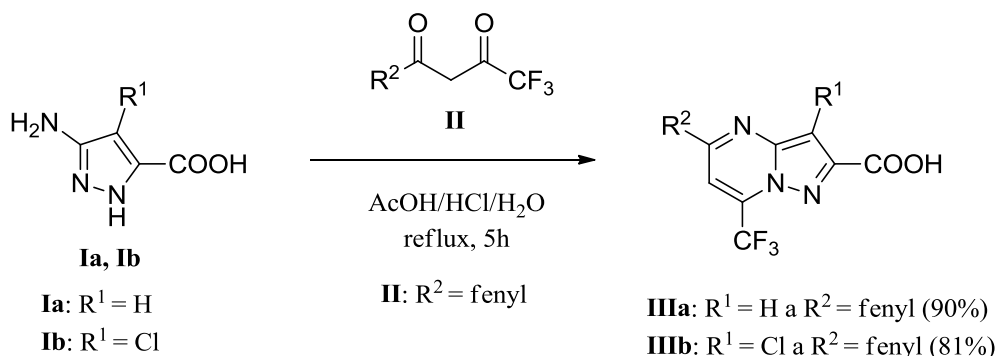
Zkoušené léčivo	Číslo	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> (nM)	FLT3-D835Y IC <sub>50</sub> (nM)
Giltertinib	<b>6</b>	1,6	1,4
Quizartinib	<b>7</b>	1,2	>100
Crenolanib	<b>8</b>	57	58
Ponatinib	<b>9</b>	<1	92
KW-2449	<b>10</b>	41	>200

### 3.2 Syntetické přístupy k pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinovému skeletu

Dodnes byla popsána celá řada syntetických metod směřujících k tvorbě pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového jádra a vývoj nových cest k jejich přípravě nadále roste. U většiny metod se vycházelo z různě substituovaného aminopyrazololového heterocyklu. V této kapitole jsou stručně zmíněny některé základní, již dříve publikované přístupy.

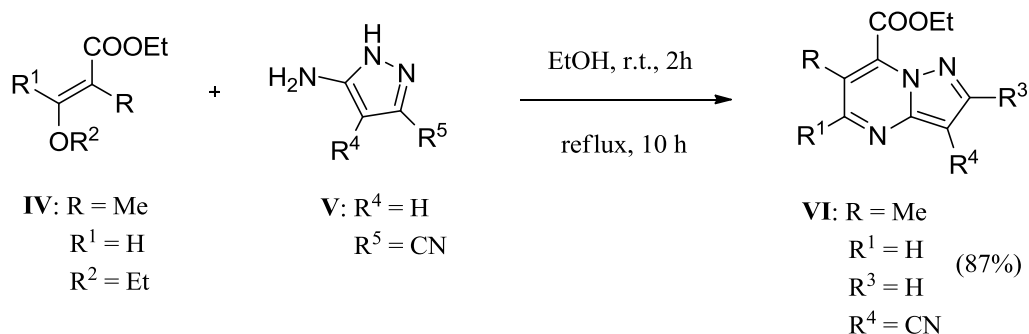
Jednou z možností syntézy požadovaného pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového skeletu je příprava pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových karboxylátů. V tomto případě se vychází z 5-aminopyrazolkarboxylové kyseliny **Ia**, **Ib**, pro jejíž cyklizaci je vyžadována přítomnost trifluoromethyl- $\beta$ -diketonu **II**. Reakce běží v prostředí kyseliny octové pod refluxem 5 hodin. Ve schématu jsou uvedeny 2 příklady této syntetické cesty se získáním 81% výtěžku látky **IIIa** a 90% látky **IIIb** (schéma 1) [106].

**Schéma 1:** Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových karboxylátů **IIIa**, **IIIb** ( $R^2 =$  až 14-ti substitučním možnostem, viz článek: *Liquid phase synthesis*)



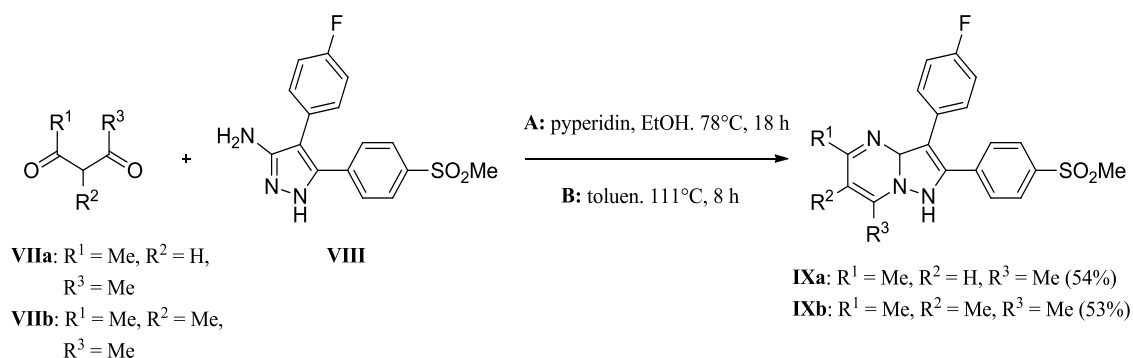
Další možností je reakce  $\beta,\gamma$ -nenasyceného  $\gamma$ -alkoxy- $\alpha$ -ketoesteru **IV** s 5-aminopyrazolem **V**, která je vysoce selektivní k získání pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu nesoucího v poloze 7 esterovou skupinu. Tato syntéza probíhá za níže popsaných podmínek, opět pod refluxem 10 hodin. Výtěžek **IV** činí 87% (schéma 2). Publikace dle Stepaniuk et al., 2013 popisuje sérii látek připravených tímto syntetickým přístupem se zajímavou aktivitou a s potenciálem možných terapeutických cílů v léčbě nádorových onemocnění [107].

**Schéma 2:** Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **VI** s funkční esterovou skupinou v poloze 7.



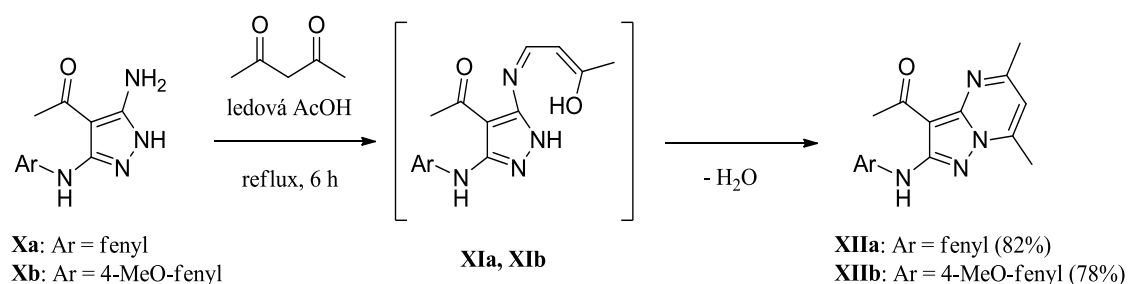
Almansa et al., 2001 nasynthetizovali různé pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny například kondenzací 1,3-dikarbonylu s 4,5-disubstituovaným pyrazolem. První syntetická cesta s výchozí látkou **VIII** a 1,3-dikarbonylovou sloučeninou **VIIa** probíhá za podmínek A a dává zisk 54% produktu **IXa**. Druhá popisuje reakci VL **VIII** s **VIIb**, která pro zisk 53% **IXb** vyžaduje podmínky B (schéma 3) [108,109].

**Schéma 3:** Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových derivátů **IXa** a **IXb**.



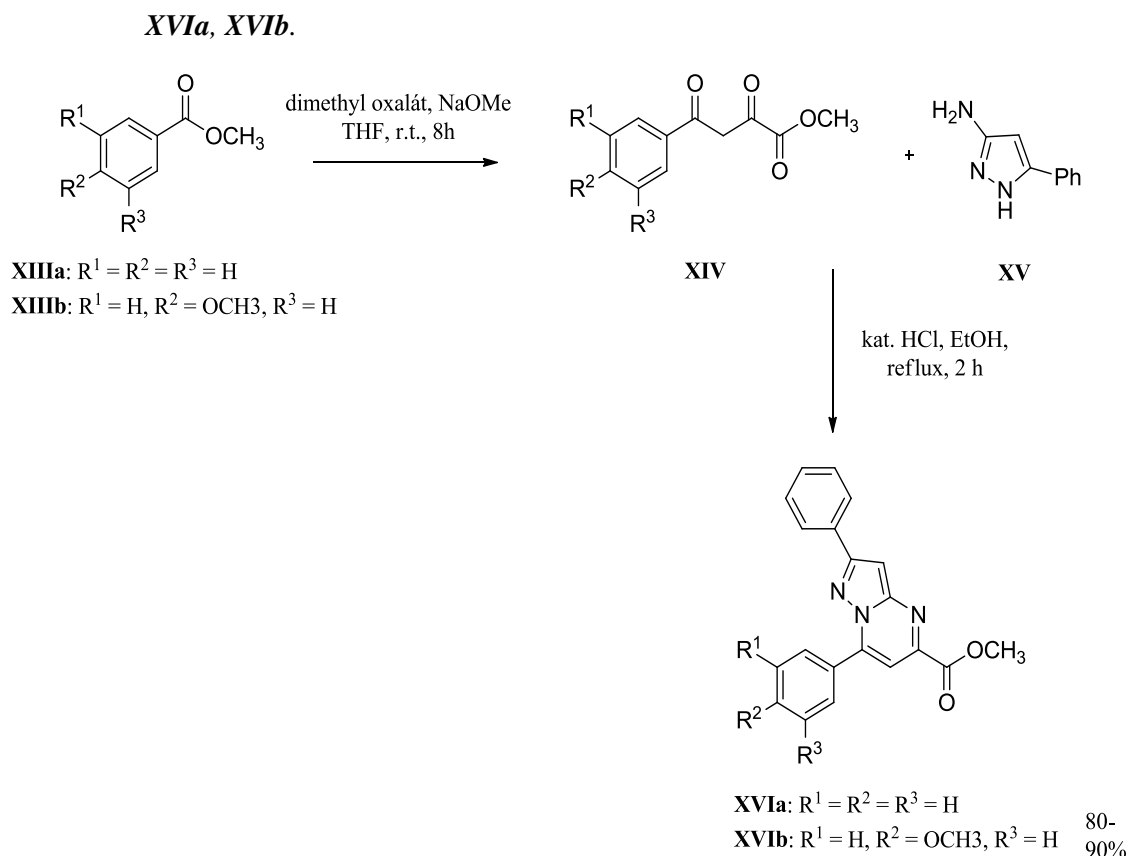
Jiným způsobem lze získat např. 2-(arylamino)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-karboxamidy. Tvorba těchto derivátů je umožněna díky reakci 5-amino-4-pyrazolkarboxamidu **Xa**, **Xb** s acetoacetátem v ledové kyselině octové pod zpětným chladičem, s 6-ti hodinovou reakční dobou. Po zpracování jsou produkty izolovány rekrystalizací z etanolu s výtěžky 82% **XIIa** a 78% **XIIb** (schéma 4) [110].

**Schéma 4:** Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových derivátů **XIIa** a **XIIb**.



Reakce různě substituovaných acetofenonů **XIIIa**, **XIIIb** s dimethyl oxalátem, v přítomnosti methoxidu sodného a rozpouštědla THF, probíhající za laboratorní teploty 8 hodin, vedou k tvorbě  $\beta$ -diketoesterů **XIV**, které jsou následně refluxovány 2 hodiny v ethanolu s 3-amino-5-fenyl-1H-pyrazolem (bifunkčním elektrofilem) za zisku 2,7-difenylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5-karboxylátů **XVIa**, **XVIb** s poměrně vysokou výtěžností 80-90% (schéma 5) [111].

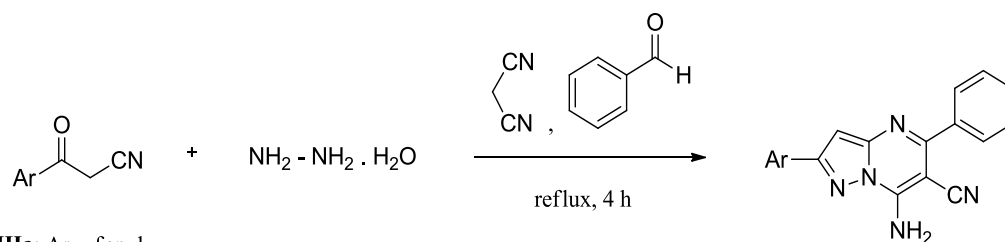
**Schéma 5:** Syntetický přístup k tvorbě 2,7-difenylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5-karboxylátů



Následující schéma znázorňuje 4-hodinovou syntézu směsi oxoalkanonitrilů **XVIIIa**, **XVIIIb** s 80% hydrazin hydrátem, benzaldehydem a malononitrilem pod refluxem. Pevné produkty **XIXa**, **XIXb** této reakce je možno získat rekrystalizací z etanolu s výtěžky nad 70% (schéma 6) [112].

**Schéma 6:** Syntéza pyrazolo[1,5-a]pyrimidinových derivátů **XIXa** a **XIXb**.





**XVIIIa:** Ar = fenyl

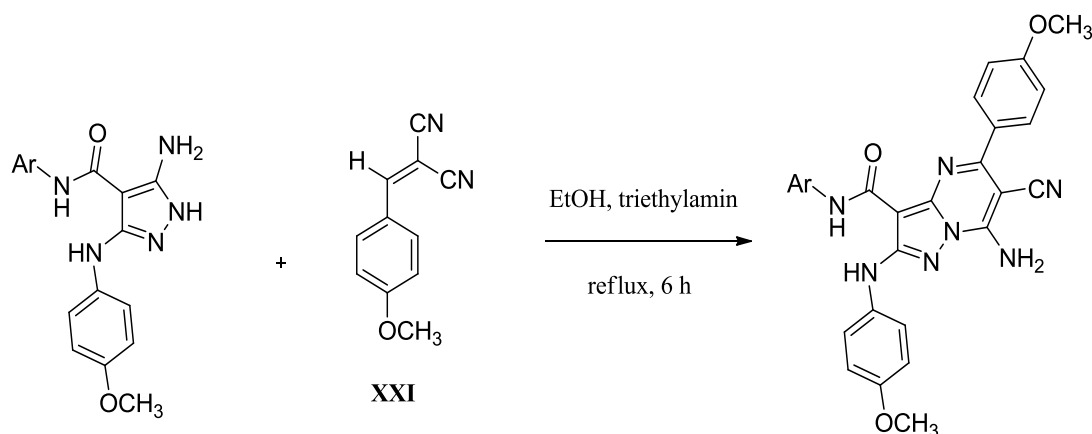
**XVIIIb:** Ar = p-(Me<sub>2</sub>)N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

**XIXa:** Ar = fenyl (71%)

**XIXb:** Ar = p-(Me<sub>2</sub>)N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (75%)

Hassan et al., 2015 ve své publikaci uvedli reakci 2-(4-methoxybenzyliden)malononitrilu s deriváty látek **XXa** a **XXb**, které byly podrobeny 6-ti hodinovému refluxu v etanolu a v přítomnosti katalytického množství triethylaminu za přípravy sloučenin s označením **XXIa** (83%) a **XXIb** (78%). Izolace pevných produktů byla provedena pomocí rekrystalizace z ethanolu (schéma 7) [113].

**Schéma 7:** Syntéza 7-amino-N-aryl-6-kyano-5(4-methoxyfenyl)-2-[amino]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-karboxamidů.



**XXa:** Ar = fenyl

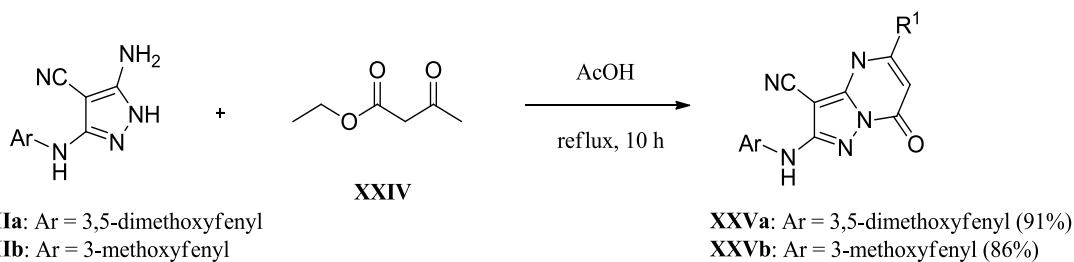
**XXb:** Ar = 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

**XXIIa:** Ar = fenyl (83%)

**XXIIb:** Ar = 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (80%)

Další možností syntetických přístupů k pyrazolo[1,5-a]pyrimidinovému skeletu jsou i reakce β-keto esterových derivátů (ve schématu 8 je jako příklad uveden ethyl acetoacetát **XXIV**) opět s výchozími aminopyrazoly **XXIIIa**, **XXIIIb** v kyselém prostředí kyseliny octové za 10-ti hodinového míchání pod refluxem. Výsledkem (schéma 8) jsou pak látky **XXVa** (91%) a **XXVb** (86%) [114].

**Schéma 8:** Syntéza pyrazolo[1,5-a]pyrimidinových derivátů **XXVa** a **XXVb**.



Jak bylo podotknuto výše, existuje mnoho syntetických přístupů k pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidovému skeletu. Jednu z možných cest vedoucích k tomuto jádru popisují i v praktické části této diplomové práce, jejíž řešená problematika se týká přípravy nových 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidových derivátů s potenciální inhibiční schopností k CDK a FLT3 kinázám.

### 3.3 Vybrané příklady biologicky aktivních pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů

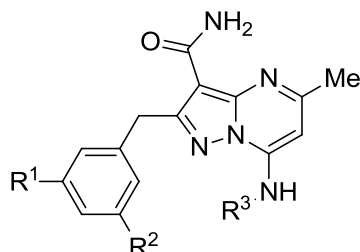
Biologický výzkum pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů ukázal, že substituce různých skupin na tomto jádře umožňuje, skrz inhibici různých enzymů, odhalit jejich protinádorovou aktivitu. Tato kapitola popisuje aktivitu vybraných pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových inhibitorů Src, CHK1 a B-Raf kináz a CDK [115].

#### *Src inhibitory*

Src, člen non-receptorového proteinu tyrozin-kinázové rodiny (SFK), je tvořen 9-ti různými proteinovými tyrosin-kinázami (c-Src, c-Yes, Fyn, Lck, Hck, Blk a c-Fgr – kde je Src prototypem) [116]. Src se účastní přechodné komunikace mezi mnoha signálními drahami, včetně receptorů EGFR, Ras/Raf, PI3K/AKT, JAK/STAT dráhy a integrin/FAK, které podporují buněčnou adhezi, migraci, invazi, proliferaci, metastázi a tumorigenezi [117,118]. Zvýšená hodnota Src + její abnormálně zvýšená katalytická aktivita byla pozorována u řady lidských rakovin, například u rakoviny prsu, plic, vaječníků, krku a hlavy [119], tlustého střeva a žaludku [120,121]. SFK má též uplatnění v přežití a růstu nádorových buněk a motilitě v různých nádorových entitách, včetně osteosarkomu a Ewingově sarkomu [122]. Src dokáže pozměnit invazi i migraci buňky prostřednictvím interakce s ohniskovou adhezní kinázou (FAK), integriny a regulátory rodiny Rho-GTPas [123,124]. Mukaiyama s jeho kolektivem zkoumali v roce 2007 [114] neuroprotektivní aktivitu pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů (látky **13a-e**) jako potenciálních Src kinázových inhibitorů (Tab. 3) při lidské mozkové mrtvici. Také

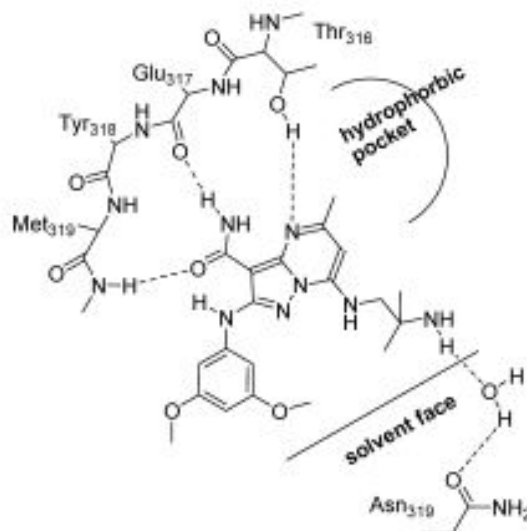
zjistili, že se tyto molekuly podílejí na prevenci vaskulární permeability indukované VEGF, umí blokovat angiogenezi, snížit výskyt edému a funkčních ztrát spojených s nádory, experimentální vaskulární okluzí mozku a infarktem myokardu [125].

**Tabulka 3:** Hodnoty  $IC_{50}$  sloučenin **12**, **13a-e** u *c-Src* [114,115].



Sloučenina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	<i>c-Src</i> /IC <sub>50</sub> (μM)
<b>12</b>	3'-MeO	5'-MeO	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,64
<b>13a</b>	3'-MeO	5'-MeO	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHMe	2,73
<b>13b</b>	3'-MeO	5'-MeO	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	27,8
<b>13c</b>	3'-MeO	5'-MeO	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	33,7
<b>13d</b>		H	-CH <sub>2</sub> cPr	2,48
<b>13f</b>	3'-MeO	5'-MeO	-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,18

Vztahy mezi strukturou a aktivitou (SAR) syntetizovaných sloučenin odhalily, že koncový primární amin i délka uhlíkového řetězce jsou důležitými faktory v inhibiční aktivitě *c-Src*, a že 7-ethylendiaminová skupina napodobuje trifosfátovou skupinu adenosin trifosfátu (ATP kapsu). Navíc bylo zjištěno, že náhrada alifatických aminů aryl- či heteroaryl-aminy v poloze 4, které se podílí na hydrofobní interakci s hydrofobní vazbou sousedící s ATP vazebným místem, zvyšuje inhibiční schopnost této tyrosin-kinázy. 3-karboxyamidová skupina a NH skupina 2-aminofenylového kruhu interaguje s několika aminokyselinovými rezidui, to vede k růstu jejich vazebné afinity k vazebnému místu ATP, díky čemuž elektron-donorové substituenty na fenylovém jádře (př. methoxy skupina) zvyšují inhibici *c-Src* [126]. Sloučenina **13e** (Obr. 15), s hodnotou  $IC_{50} = 0,18$  nM, projevila významnou intracelulární inhibici *c-Src* v buněčném testu, ELISA testu (Enzyme-linked immunosuppressive assay), za použití COS7 buněk. Hydrochlorid látky **13e** dobře proniká do CNS mozku a je považován za nové terapeutické činidlo pro léčbu akutní ischemické mozkové mrtvice [115,126].



**Obr. 15:** Schématické znázornění vazebného módu látky **13e** v *c*-Src kináze. NH 3-

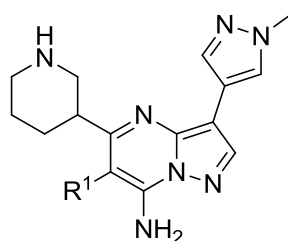
karboxamidové skupiny vytváří H-vazbu s karbonylovou skupinou Glu317 (Glu 341 v *c*-Src) a karbonylová skupina **13e** interakci s NH skupinou Met 319 (Met 343 v *c*-Src). N-4 pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu tvoří vodíkovou vazbu s OH skupinou Thr 316 (Thr 340 v *c*-Src) a koncová primární amino-skupina v pozici-7 formuje skrz H-vazbu přemostění k Asn 319 [115].

### ***Inhibitory CHK1***

Lidská kontrolní kináza CHK1 je specifickou serin-threoninovou kinázou, která má důležitou úlohu v regulaci buněčného cyklu v G2/M kontrolním bodě [127]. Kontrolní body umí v určitých fázích, v reakci na varovné signály, zastavit buněčný cyklus (BC). Signály upozorňují hlavně na poškození DNA a mitotického vřetenka nebo na nekompletní buněčný proces, čili replikaci DNA nebo uspořádání chromozomů [128]. CHK1 je zodpovědná za dozor nad kontrolními body S a G2 fáze, nikoli však G1 fáze. Funkce proteinu p53-deficitního na nádorové buňky je odkázána na CHK1, která v odpovědi na zastavení replikace či poškození DNA zaktivuje S- a G2- kontrolní body [129]. Abnormální hladiny CHK1 v mRNA byly pozorovány například u nemocných s kolorektálními karcinomy a s trojitě negativní rakovinou prsu (se ztrátou exprese pro ER, progesteron receptor a HER2) [130,131,132]. Léčba p53-deficitních nádorů sestává ze dvou fází: první je činidlo, které vyvolá replikaci nebo genotoxický stres, druhou je CHK1 inhibitor, spouštějící apoptózu nádorových buněk [133].

Marc a jeho spolupracovníci identifikovali v r. 2011 nové struktury pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů (**14**, **15a-c**) jako CHK1 inhibitory se srovnatelnou selektivitou k CDK2 (Tab. 4) [134]. Zmíněná skupina vědců se věnuje rozvoji SAR tohoto jádra v C5 a C6 pozicích, v kombinaci dříve odhalených SAR v pozicích C3 a C7. Je zajímavé, že sloučeniny **15a-c** s halogenem v poloze 6 projevily 20 krát vyšší aktivitu CHK1 než původní sloučenina **14**. Látky **15a-c** obsahují v pozici C3 (*N*-methylpyrazol) a v poloze C5 (3-piperidin), což bylo dříve rozlišováno jako nezbytné pro účinnost CHK1. Dále je vhodné mít substituent s odstupujícím elektronem, např. 6-halogen deriváty, které hrají rozhodující roli v modulaci kyselosti sousední C7-NH<sub>2</sub> skupiny [135].

**Tabulka 4:** CHK1 a CDK2 inhibiční aktivita pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů **14**, **15a-c** [134].



Sloučenina	R <sup>1</sup>	CHK1 IC <sub>50</sub> (μM)	CDK2/cycA IC <sub>50</sub> (μM)
<b>14</b>	H	0,06	6,1
<b>15a</b>	Cl	0,003	0,31
<b>15b</b>	Br	0,003	0,16
<b>15c</b>	I	0,003	0,33

### ***B-Raf kinázové inhibitory***

Proteinová kináza B-Raf je klíčovým prvkem buněčné signální dráhy (RAS-RAF), řídící buněčnou proliferaci a přežití buněk pod kontrolou extracelulárních růstových faktorů a hormonů [136]. Abnormality/mutace v kinázové doméně genu B-Raf mohou vést k nekontrolované aktivaci enzymu, což vede k deregulaci proudu signalizací MEK & ERK, nadměrné proliferaci buněk a jejich přežití nezávisle na vnějších buněčných signálech. Podle toho dráha RAS-RAF-MEK-ERK hraje rozhodující roli v tumorigenezi [137,138]. Onkogenní signalizace B-Raf je pozorována přibližně u 50% melanomů, 30-70% papilárních nádorů štítné žlázy, 30% low-grade

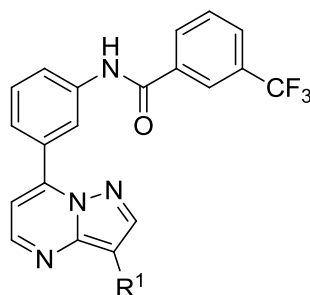
serózních karcinomů vaječníku a 8-10% kolorektálních karcinomů [137]. Vývoj nových B-Raf inhibitorů směřuje k velmi rychlým nádorovým odezvám a zvyšuje celkové přežití ve srovnání se standardní chemoterapií [139,140,141].

Berger a spol. připravili v roce 2009 [142] sérii C3 substituovaných *N*-(3-(pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-yl)fenyl)-3-(trifluoromethyl)benzamidů (**16a-d**). Nejvyšší účinnost je pozorována u para-substituovaných sloučenin **16b-d**, naopak nižší aktivita se projevila u meta-substituovaných analogů (př. **16a**). Buněčná aktivita těchto derivátů **16a-d** proti B-Raf, WM266-4 a HT29 liniím je popsána níže (Tab. 5) [142].

Absence H-vazby k závěsné oblasti a hydrofobní vazebné interakce trifluoromethylbenzamidové skupiny s enzymy jsou považovány za hlavní důvody, které zvyšují vazebnou afinitu k analogu **16b**, jelikož jim to umožňuje velmi dobře zapadnout do hydrofobní kapsy. Dále tvoří 2 H-vazby, jednu z amidové NH- skupiny k Glu500 a druhou z amid-karboxylu k Asp593 s extra hydrofobními interakcemi mezi C-3 fenylovým jádram a rezidui Leu596 a Ile462 cíleného enzymu [142].

Tyto zmíněné sloučeniny **16a-d** byly profilovány proti panelu 16-ti kináz. Látka **16b** byla ekvipotentní proti c-Raf s hodnotou  $IC_{50} = 0,025 \mu M$ . Mírná selektivita byla pozorována u této látky proti p38a ( $IC_{50} = 0,216 \mu M$ ) a CAMKII ( $IC_{50} = 0,822 \mu M$ ), zatímco vysoká selektivita byla potvrzena např. proti PI3Ka, PDK1, CKD2, CDK4, JNK1 a Src s  $IC_{50} > 2 \mu M$  [142].

**Tabulka 5:** B-Raf kináza a buněčná aktivita pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových analogů **16a-d** [142].



Sloučenina	R <sup>1</sup>	B-Raf IC <sub>50</sub> (μM)	WM266-4 IC <sub>50</sub> (μM)	HT29 IC <sub>50</sub> (μM)
<b>16a</b>	3-Ph-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,044	1,3	0,8
<b>16b</b>	4-Ph-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,024	0,92	0,78
<b>16c</b>	4-Ph-CH <sub>2</sub> -pyrrolidin	0,02	2,1	0,65
<b>16d</b>	4-Ph-CH <sub>2</sub> -methyl	0,038	0,82	0,7

---

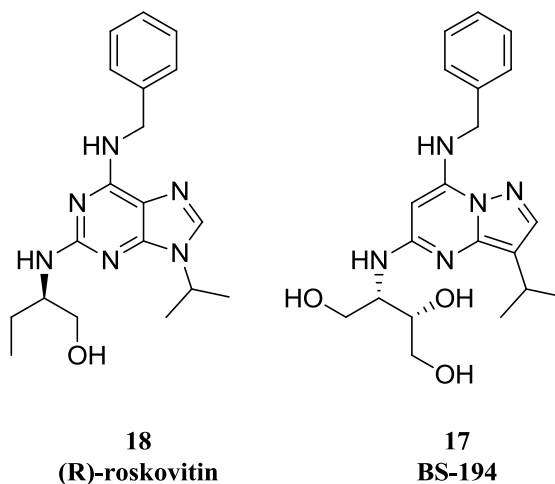
***Inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKi)***

Lidský genom kóduje 21 cyklin-dependentních kináz (CDKs), 7 z nich (CDK1-4, 6, 10 a 11) má zásadní úlohu v regulaci buněčného cyklu (BC). CDK4 a CDK6 zprostředkovávají postup skrz G1 fázi, CDK2 je hlavním regulátorem G1 a S fáze BC [143]. V G1 fázi je CDK2 slučována s cyklinem E (cyc E), v S fázi s cyklinem A (cyc A) v komplex, který skrz fosforylaci proteinů řídí syntézu DNA a zároveň inaktivuje transkripční faktory E2R [144.145]. CDK1 po asociaci s cyc A a cyc B řídí přechod mezi G2 a M fází [146]. Další cyklin-dependentní kinázy přebírají zodpovědnost za aktivaci jiných CDK (nepřímá role u CDK3), regulaci transkripce (CDK7-9) a neuronální funkce (CDK5) [143]. CDK7 společně s cyklinem H a MAT1 tvoří CDK-aktivační kinázu (CAK), která aktivuje CDKs buněčného cyklu fosforylací na treoninovém zbytku v T-loop vazebné smyčce a CDK9 je po interakci s cyc T zodpovědná za kontrolu transkripce RNA polymerázy II [147.148.149]. CDKs mají roli nejen v řízení BC, jsou nepostradatelné i při epigenetické regulaci, již výše zmíněné transkripci, metabolismu, subregulaci kmenových buněk, funkci neuronů a spermatogenezi [159]. Během dvou desítek let vědci vyvinuli řadu CDK inhibitorů, z nichž byla značná část, díky své významné selektivitě, podrobena úspěšným klinickým zkouškám [150,151]. Proto se tyto nízkomolekulární sloučeniny (< 600 g/mol) jeví jako vhodné cíle pro léčbu mnoha typů nádorového onemocnění, ale i dalších, jako například neurodegenerativní či kardiovaskulární choroby, virové infekce, glomerulonefritidu a onemocnění způsobené jednobuněčnými parazity [145,152].

Dean a spol. představili v r. 2010 [148] nový pyrazolo[1,5-a]pyrimidinový derivát **17 (BS-194)**, jako selektivní a účinný CDKi, který inhibuje CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9 s  $IC_{50} = 3, 30, 30, 250$  a  $90$  nM (tabulka 7). Buněčné studie ukázaly, že tato látka inhibuje fosforylaci substrátu, Retinoblastoma protein (Rb) a C-koncové domény RNA polymerázy II, způsobenou proudem regulací cycA, cycE a cycD1, které vedou k zablokování BC, jak v G1/M, tak i v S fázi. **BSK-194** též popsuje antiproliferační aktivitu u 60 nádorových buněčných linií s  $IC_{50} = 280$  nM. Tyto poznatky začleňují **BSK-194** do kategorie selektivních CDKi s potenciálem pro orální podání pacientům s rakovinou. Ve srovnání s analogy 2,6,9-trisubstituovaných purinů (Tab. 6), jako je např. **roscovitin 18**, vykazující pozitivní farmakologické i biologické

vlastnosti jako CDK-selektivní ATP antagonisté [153]. SAR podotýká, že volná OH skupina je nezbytná pro dobrou selektivitu a vysokou inhibici CDK7 [115].

**Tabulka 6:** Inhibiční aktivita *roskovitinu* a *BS-194* u CDKs [153].

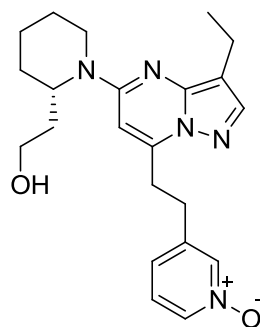


Kináza	18, roskovitin IC <sub>50</sub> (μM) (SD)	17, BS-194 IC <sub>50</sub> (μM) (SD)
<b>CDK1</b>	2,1 (0,5)	0,033 (0,01)
<b>CDK2</b>	0,1 (0,05)	0,003 (0,001)
<b>CDK4</b>	13,5 (0,2)	20 (1,3)
<b>CDK5</b>	0,16 (0,2)	0,03 (0,006)
<b>CDK6</b>	23,5 (1,3)	35,5 (1,3)
<b>CDK7</b>	0,54 (0,09)	0,25 (0,04)
<b>CDK9</b>	0,95 (0,17)	0,09 (0,01)

*SD = směrodatná odchylka ze 3 experimentů.*

Paruch a jeho kolektiv ve stejném roce odprezentovali další novou látku na bázi pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu, a to **dinaciclíb** (**SCH727965** nebo **MK-7965**). **SCH727965** (Obr. 16) je jedním z představitelů CDK<sub>i</sub>, který vykazuje inhibiční účinky proti CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 s IC<sub>50</sub> v rozmezí 1-4 nM [153,154,155,156]. Dinaciclíb je schopen blokovat transkripci apoptotických proteinů, jejich růst, migraci, tvorbu kolonií pankreatických nádorových buněk i jiných nádorů. SCH727964 byl též začleněn do klinických zkoušek u rakoviny prsu, soliních a hematologických malignit. Nacházel se již ve III. fázi klinických studií u pacientů trpících CLL, bohužel byl v této fázi, kvůli nežádoucím vedlejším účinkům, stažen [153,154,155,156,157].





19

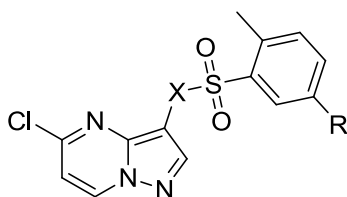
**dinaciclib**

CDK1,2,5,9: IC<sub>50</sub> = 1-4 nM

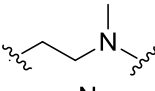
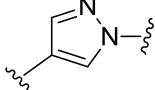
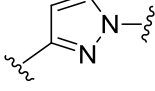
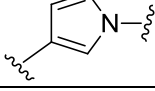
**Obr. 16:** Struktura *dinaciclibu* a její inhibiční aktivita k CDK1,2,5 a 9 [153.154.155.156].

Phillipson a jeho výzkumný tým uvedli v r. 2015 [158] novou sérii selektivních CDK inhibitorů (**20**, **21**, **22a-b**, **23a**) s jejich inhibiční aktivitou k CDK7, CDK9, PI3Ka a FLT3, znázorňující antiproliferační účinky na leukemické buněčné linii MV4-11 (Tab. 7). Záměnou metabolicky labilní hydrazinové skupiny ve sloučenině **20** za ethylamino linker (látky **21**, **22a-b**) dojde ke zvýšení aktivity CDK9, kromě toho vede k jejímu zlepšení i *N*-methylace sulfonamidu. Zavedením heterocyklu jako linkeru (**23a-c**) ztrácí CDK9 veškerou aktivitu, a to kvůli jejich snížené flexibilitě, která pak těmto sloučeninám neumožňuje vstoupit do ATP vazebného místa. Nicméně látky **23a** a **23c** představují dobrou aktivitu pro PI3K. Téměř u celé série látek popsanych Phillipsonem a jeho kolegy byla pozorována zajímavá inhibiční aktivita pro FLT3 [158].

**Tabulka 7:** IC<sub>50</sub> sloučenin **20**, **21**, **22a-b**, **23a-c** u CDK7, CDK9, PI3Ka a FLT3 [158].



Sloučenina	R	X	CDK7 IC <sub>50</sub> (nM)	CDK9 IC <sub>50</sub> (nM)	PI3Ka IC <sub>50</sub> (nM)	FLT3 IC <sub>50</sub> (nM)	MV4-11 IC <sub>50</sub> (nM)
<b>20</b>	CN		22	3590	2960	33	0,364
<b>21</b>	NO <sub>2</sub>		1144	NT	900	184	0,166
<b>22a</b>	NO <sub>2</sub>		265	NT	1870	516	0,374

<b>22b</b>	CN		203	>10000	>10000	219	0,177
<b>23a</b>	NO <sub>2</sub>		>10000	1680	194	361	1,9
<b>23b</b>	NO <sub>2</sub>		>10000	NT	1070	346	1,28
<b>23c</b>	NO <sub>2</sub>		>10000	NT	164	58	0,123

*NT = netestováno.*

Tato práce zahrnuje přípravu derivátů 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu, jako potenciálních inhibitorů nejen cyklin-dependentních, ale i FLT3 kináz.

#### 3.4 Význam řešené problematiky ve vztahu k cílům diplomové práce

Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro biologický a technologický výzkum UP v Olomouci se již řadu let věnuje studiu struktury a biologické aktivity vybraných derivátů 2,6,9-trisubstituovaného purinu. Na základě zjištění jejich významné CKD inhibiční aktivity (především CDK2) a zajímavé cytotoxicity u vybraných leukemických linií, byla jistá skupina derivátů těchto látek podrobena dalším zkouškám, pro zjištění jejich schopnosti inhibovat rekombinantní FLT3-ITD kinázu, a také pro vyhodnocení jejich antiproliferační aktivity v buněčných liniích myeloidní leukémie (hlavně u MV4-11 – akutní, FLT3-ITD pozitivní a K562 – chronická, FLT3-ITD negativní) [4].

Testování bylo provedeno u série nově připravených purinových derivátů, konkrétněji u 6-(4-substituovaných-anilino)purinů a 6-(5-substituovaných-3-aminopyridinových)purinových derivátů. Vztahy mezi strukturou a aktivitou byly započaty studiem dvou molekul se substitucí 4-aminocyklohexylamino skupinou v pozici C2, 4-chlorfenylamino a 4-bromfenylamino skupinami v pozici C6 a cyklopentylem v pozici N9. Tyto látky vykazovaly vysokou selektivitu vůči FLT3-ITD pozitivním buňkám a slabou aktivitu pouze u buněčné nádorové linie K562 [4].

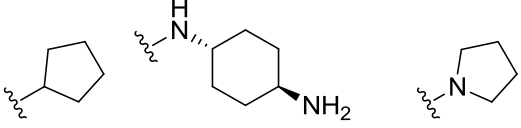
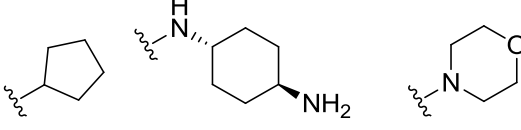
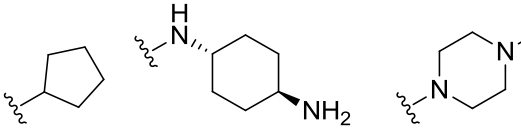
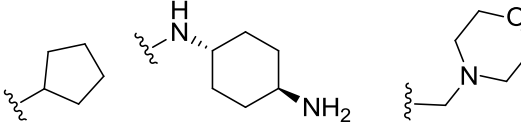
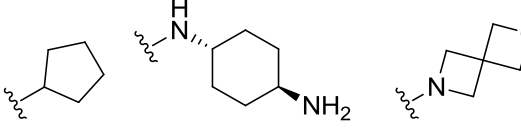
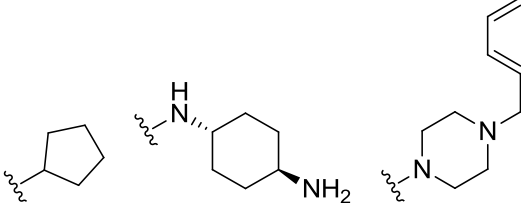
Pro studium vlivu substituce v pozici N9 purinového jádra byly tyto počáteční sloučeniny porovnávány na sérii analogů se stejnými substituenty v polohách C2 a C6, ale s izopropylou, tetrahydropyran-2-ylou či benzylovou skupinou v pozici N9. Nejnižší hodnoty cytotoxicity ( $GI_{50}$ ) byly prokázány u sloučenin nesoucích v této pozici izopropylou (7 nM) a cyklopentylou (10 a 21 nM), také bylo zjištěno, že tyto látky jsou velmi účinnými inhibitory FLT3-ITD. Přítomnost zmíněné tetrahydropyran-2-ylé skupiny snižuje jak buněčnou, tak i kinázovou inhibiční aktivitu sloučenin. Podstatně horší biologická aktivita byla vypořádaná u sloučenin, které byly v pozici 9 substituovány benzylem [4].

K ověření pozitivního vlivu substituce v poloze N9 byla zaměněna i pozice C2, a to náhradou 4-aminocyklohexylamino skupiny za různě rozvětvené alkylaminy nebo objemné morfolino či 4-methylpiperazin-1-ylé skupiny. Všechny analogy substituované tímto způsobem vykazovaly slabší antiproliferační i FLT3-inhibiční aktivitu než 4-aminocyklohexylamino substituované sloučeniny. U těchto molekul byly zaznamenány podstatně vyšší hodnoty  $GI_{50}$  i  $IC_{50}$  [4].

Dále byl zkoumán vliv prodloužení substituentu v pozici C6, s cyklopentylou skupinou v pozici N9 a s 4-aminocyklohexylamino skupinou v pozici C2 (**24a-f**) (Tab. 8). Halogen fenylaminového substituentu hlavní molekuly byl nahrazen pyrrolidin-1-ylem (**24a**), morfolin-4-ylem (**24b**), 4-ethylpiperazin-1-ylem (**24c**), morfolin-4-ylmethylem (**24d**), 2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-ylem (**24e**) nebo N-4-benzyl-piperazin-1-ylem (**24f**). Tyto sloučeniny byly mezi nejaktivnějšími v celé sérii: jejich hodnoty cytotoxicity v FLT3-ITD pozitivních MV4-11 buňkách byly zjištěny v jednomístném nanomolárním rozsahu a přibližně 100 krát nižší než hodnoty odpovídající buňkám K562. Projevily také silnou inhibici enzymatické aktivity FLT3-ITD při nízkých nanomolárních koncentracích. Z toho vyplývá, že pozice C6 může hostit různé substituce bez významné ztráty *in vitro* aktivity [4].

**Tabulka 8:** 2-(4-aminocyklohexylamino)-6-(4-substituované-fenyl)amino-9-cyklopentyl-9H-puriny **24a-f** a jejich biochemické (rekombinantní FLT3-ITD) a buněčné aktivity [4].

Látka	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> (μM)	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> (μM)	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> (μM)
-------	----------------	----------------	----------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------

<b>24a</b>		0,003	0,018	0,940
<b>24b</b>		0,002	0,002	0,965
<b>24c</b>		0,003	0,001	2,070
<b>24d</b>		0,003	0,002	0,380
<b>24e</b>		0,004	0,003	1,220
<b>24f</b>		0,006	0,017	0,700

Bylo zjištěno, že nejaktivnější sloučeniny série (**24b-24d**) mají prodloužené 6-(4-substituované-fenylamino) skupiny a cyklopentylovou skupinu v pozici N9. Zbývalo ještě prozkoumat analogy těchto látek v pozici C2, aby se zjistilo, zdali je 4-aminocyklohexylaminová skupina optimální substituent s ohledem na aktivitu *in vitro*. Byly zkoumány lineární aminoalkylaminy, hydroxyalkylaminy, objemné nasycené heterocyklické části nebo aromatické substituenty [4]. Sloučeniny s 4-aminobutylamino skupinou v poloze C2 vykazovaly srovnatelnou účinnost proti FLT3-ITD k počátečním molekulám (**24d**, **24b** a **24c**) a inhibovaly proliferaci MV4-11 buněk při nízkých nanomolárních koncentracích s hodnotami  $GI_{50} \sim 11$  nM. Dlouhé aminoalkylové postranní řetězce vedly ke slabším antiproliferačním a inhibičním kinázovým aktivitám: hodnoty  $IC_{50}$  u FLT3-ITD pro butylem, pentylem a hexylem substituované sloučeniny byly 1, 5 a 10 nM a příslušné hodnoty  $GI_{50}$  u MV4-11 byly 11, 35 a 86 nM. Sloučeniny s hydroxyalkylaminy v poloze C2 vykazovaly slabší biologickou aktivitu: nejsilnější z těchto derivátů byl 6 krát méně účinný než molekula **24d** a vzhledem k FLT3-ITD inhibici měl 40 krát vyšší hodnotu  $GI_{50}$  v MV4-11 buňkách [4]. Zkrácení hydroxyalkylového řetězce (hydroxyethylamin a hydroxypropylamin) dále snižuje in

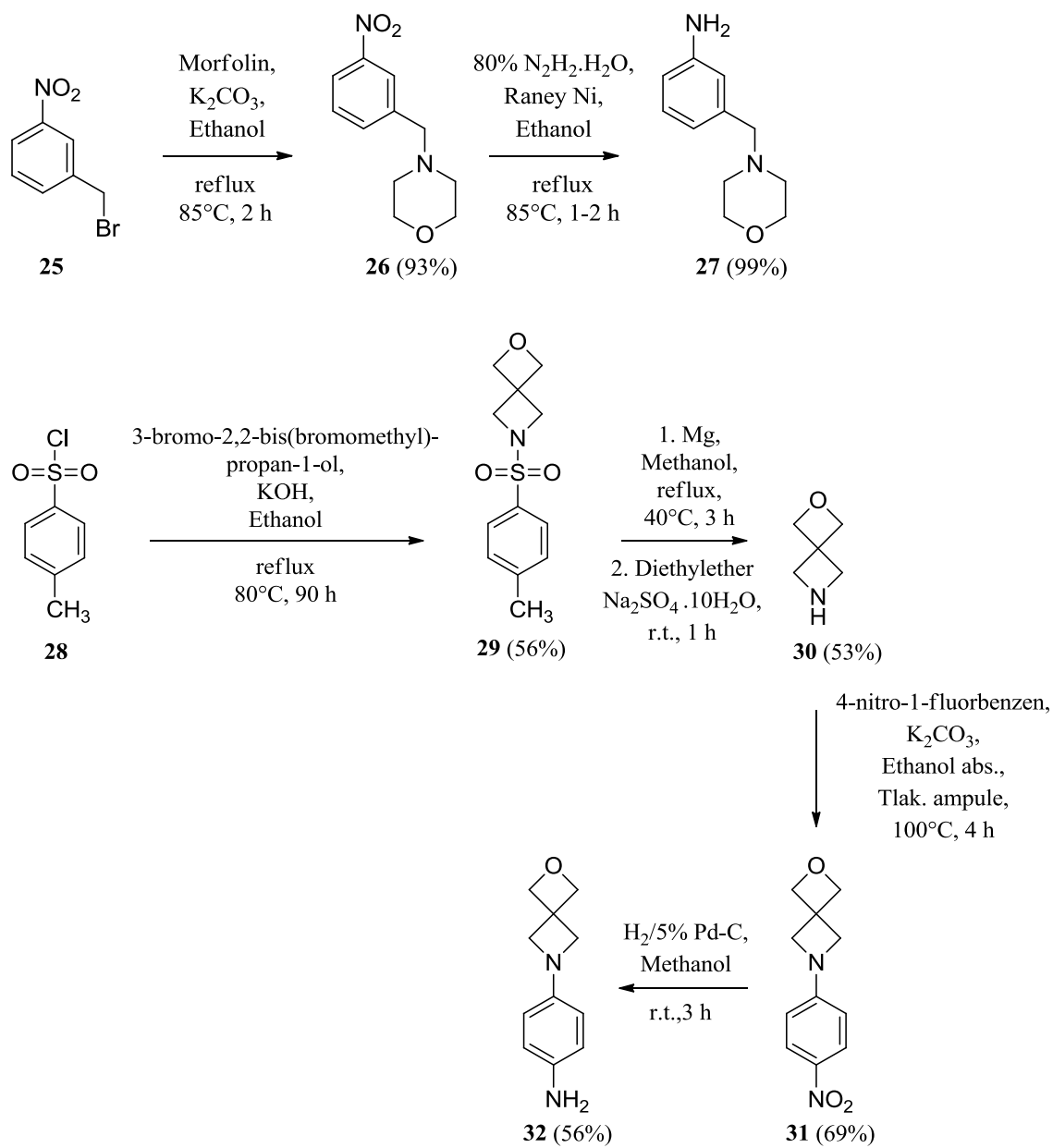
vitro aktivitu. Podobné nízké aktivity v pozici C2 byly dosaženy u sloučenin nesoucích objemné morfolinové nebo methylpiperazinové substituenty, nejméně účinné sloučeniny ve skupině byly ty, které nesly piperidinové, benzylaminové nebo 4-methoxybenzylaminové zbytky [4].

Tento syntetický přístup umožnil další modifikaci prvního aromatického kruhu v pozici C6, záměnou fenylaminu s pyridinaminem a jeho prodloužením morfolinem. Tato modifikace ovšem nezlepšila biologickou aktivitu molekul, vykazovala spíše obdobnou aktivitu k fenylaminovému protějšku **24d** [4].

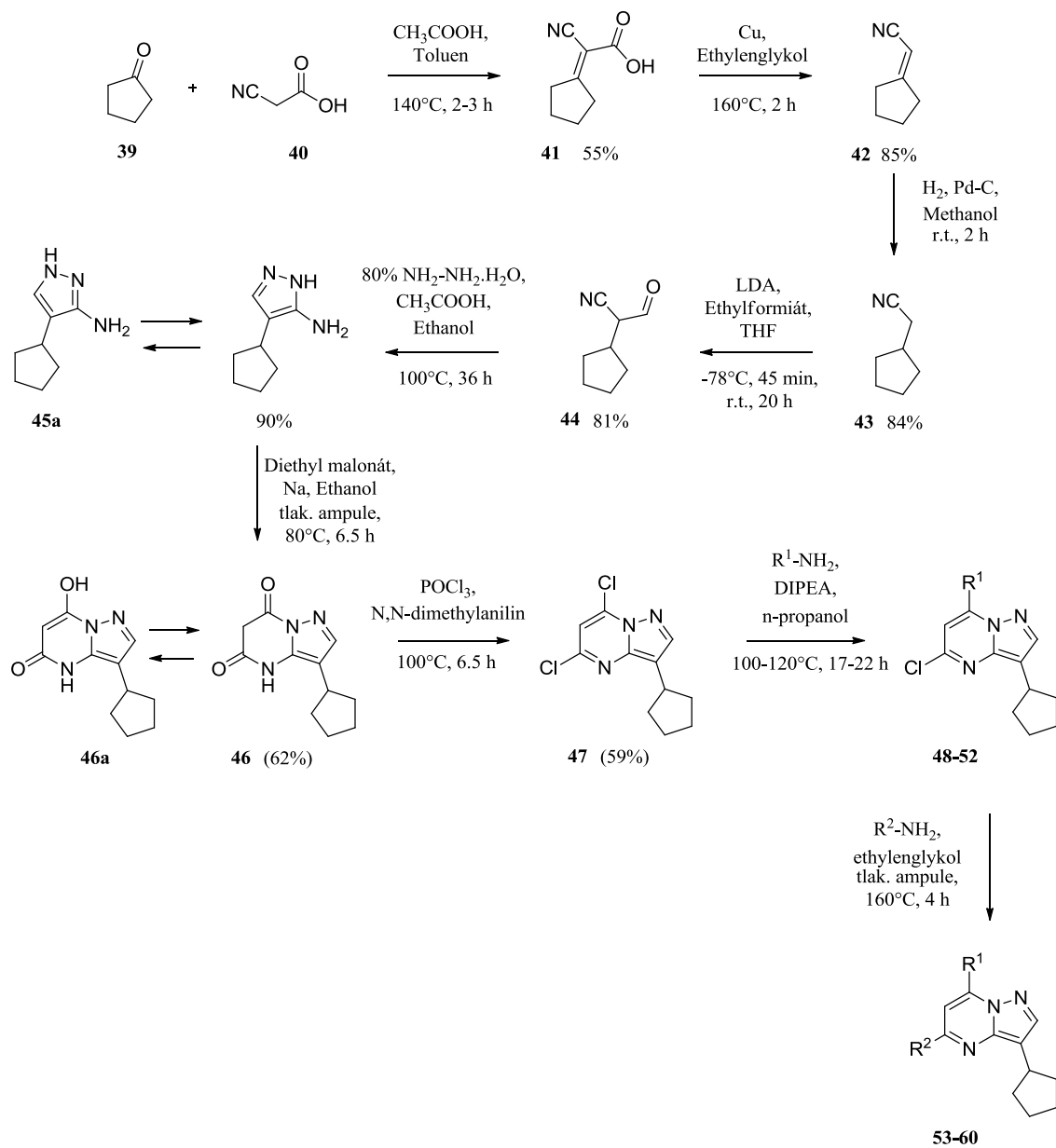
Zajímalo nás, zdali se podobná biologická aktivita prokáže také u 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů. Na základě toho byla připravena série těchto derivátů pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu, které nesly v pozici C3 cyklopentylovou, v pozici C5 4-aminobutylamino, (*R*)-(1-ethyl-2-hydroxyethyl)-amino a 4-aminocyklohexylamino skupiny a konečně v pozici C7 vybrané amino-deriváty. Biologická aktivita tří připravených molekul **54**, **58** a **59** je popsána níže (viz. kapitola **4.5**).

## 4 Dosažené výsledky

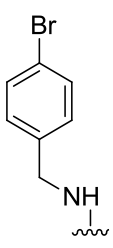
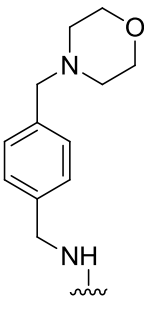
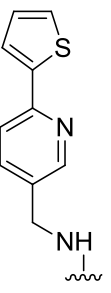
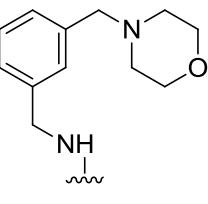
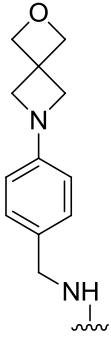
Schéma 9: Syntéza prekurzorů aminu 27 a 32.



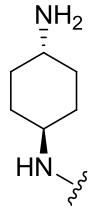
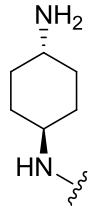

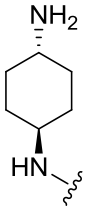
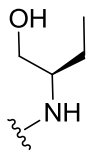
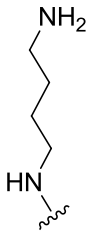
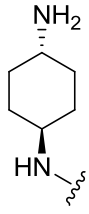
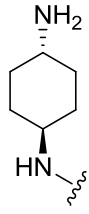
**Schéma 10:** Celkové schéma 9-ti stupňové syntézy jednotlivých prekurzorů a cílových inhibitorů 53-60.



**Tabulka 9:** *Substituce klíčových prekurzorů 48-52 v pozici 7C.*

Látka	48 (86%)	49(76%)	50(74%)	51(81%)	52(79%)
					
R <sup>1</sup>	33	34	35	27	32

**Tabulka 10:** *Substituce cílových prekurzorů 53-60 v pozici C5 a C7.*

Produkt	53 (94%)	54 (59%)	55 (34%)	56 (60%)	57 (20%)	58 (54%)	59 (76%)	60 (15%)
Výchozí látka	48	49	49	50	50	51	51	52
								
R <sup>2</sup>	36	36	37	36	38	37	36	36

#### 4.1 Syntéza prekurzorů aminu

Látka **27** [165] byla připravena pomocí 2 reakčních kroků:

Nejprve byla připravena látka **26** [165] reakcí 3-nitrobenzylbromidu **25**, morfolinu, báze K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a rozpouštědla etanolu za daných reakčních podmínek. Pro získání čistého produktu bylo potřeba provést extrakci ethylacetátem. Surový produkt byl získán ve vysokém výtěžku a bez detekce vedlejších produktů. Díky tomu nebylo nutné látku dále optimalizovat a bylo jí možné ihned použít pro následujícího kroku reakce.

Produkt z předchozí reakce **26** byl poté redukován v methanolu za přítomnosti katalyzátoru Raney niklu a postupného přikapávání 80% hydrazin hydrátu. Hydrazin



hydrát bylo nutné přikapávat velmi opatrně, aby nedocházelo k bouřlivé reakci. Při dodržení daných podmínek měla reakce hladký průběh. Surový produkt **27** [165] byl pomocí extrakce vyizolován ve vysoké čistotě. Nepodléhal tedy dalšímu čištění a byl rovnou použit k substituci pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového jádra v pozici C7.

Příprava spirocyklického amino derivátu **32** [4] byla provedena pomocí 4-stupňové syntézy:

Vycházelo se dle publikace od (Chen et al., 2014) z komerčně dostupného *p*-tosylamidu **28**, který byl refluxován s ethanolem, hydroxidem draselným a 3-bromo-2,2-bis(brommethyl)propan-1-olem [166]. V rámci mé diplomové práce se podařilo nasyntetizovat sice jen 53 % pevného produktu **29**, za to však ve 100% čistotě. Pro získání takového výtěžku byla vyžadována delší reakční doba (90 hodin), než uvádí ve své práci Gadekar et al., 2016 [167].

Následovalo odchránění *N*-tosylu z *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **29** za získání 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **30**. Deprotekce byla provedena (dle Chen et al., 2014) sonifikací látky **29** s práškovou mědí v metanolu [166].

Reakcí 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan **30** s 4-nitro-1-fluorbenzenem, s použitím báze uhličitanu draselného v absolutním etanolu byl připraven 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan **31** [4].

Konečně byla provedena hydrogenace 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **31** za atmosférického tlaku a laboratorní teploty v methanolu s použitím katalyzátoru 5% palladia na aktivním uhlí [4]. Produkt **32** byl bez nutnosti dalšího čištění použit pro substituci pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového jádra v pozici C7.

## 4.2 Syntéza výchozích prekurzorů

Látka **45** [163] byla připravena pomocí 5-ti stupňové syntézy:

Příprava této látky vycházela z komerčně dostupných reagentů: cyklopentanonu **39** a kyseliny kyanooctové **40** v prostředí octanu amonného a rozpouštědla toluenu. Tato reakce probíhala za podmínek azeotropní destilace a její průběh byl kontrolován na základě množství predestilované vody. Výsledkem byl získání 55 % produktu **41** v dobré

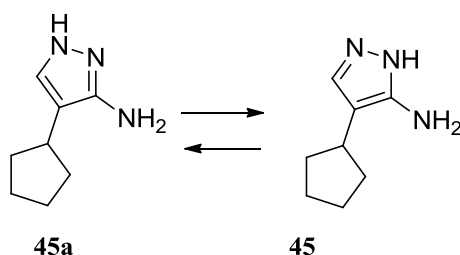
čistotě, bez nutnosti optimalizace. Sharma a Bhatia, 1989 [160] uvádí podobný postup s použitím rozpouštědla benzenu s výtěžkem 84%, ovšem tato možnost během mé diplomové práce zkoušena nebyla.

Následovala dekarboxylace **41** za použití katalyzátoru práškové mědi. Reakce probíhala při vysoké teplotě 160°C za vzniku sloučeniny **42** bez nutného čištění.

Poté byla provedena redukce dvojné vazby látky **42** pro přípravu substance **43**, a to pomocí plynného vodíku za přítomnosti katalyzátoru 10% paladia na aktivním uhlí a v rozpouštědla ethanolu [161]. Tato katalytická hydrogenace probíhala za laboratorní teploty a atmosférického tlaku. Její průběh byl hodnocen na základě spotřeby vodíku. Produktem byla molekula **43**, u níž nebyly detekovány vedlejší produkty.

Látka **43** byla dále ponechána reagovat s 2M lithiumdiisopropylethylamidem a ethylformiátem v tetrahydrofuranu za chlazení suchým ledem na -78 °C [162]. U této reakce také nebyly zjištěny vedlejší produkty, proto získaný aldehydický derivát **44** již nepodléhal dalšímu čištění.

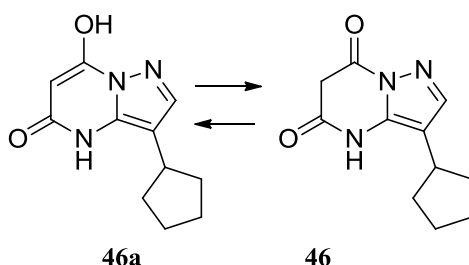
Konečně byla provedena cyklizace látky **44** za přítomnosti 80% hydrazin hydrátu, kyseliny octové a daných reakčních podmínek. Surový produkt **45** [163] byl čištěn nejprve acidobazickou extrakcí, následně i kolonovou chromatografií. Čistý amino-pyrazolový derivát byl nestabilní a tvořil 2 tautomerní formy: 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-3-amin **45a** a 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-amin **45** (Obr. 17). Prostřednictvím NMR analýzy bylo zjištěno, že mírnější preferenci vykazuje 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminová forma **45**.



**Obrázek 17:** Látka **45** a její tautomerní forma **45a**.

Před zahájením cyklizace látky **45** byl nejprve připraven epoxid sodný reakcí sodíku s absolutním etanolem. Poté byla látka **45** ponechána reagovat s čerstvě připraveným ethoxidem sodným (báze) a diethylesterem kyseliny malonové za daných reakčních

podmínek. Vzniklá suspenze byla zfiltrována, pevná látka byla následně rozpuštěna ve vodě a pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové byl vysrážen pevný produkt ve 100% čistotě [164]. Produkt cyklizace vytvářel také 2 tautomerní formy: 3-cyklopentyl-7-hydroxypyrazolo[1,5-a]pyrimidin-5(4H)-on **46a** a 3-cyklopentylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dion **46** (Obr. 18). Pomocí NMR analýzy lze odhadnout, že vyšší preference náleží pravděpodobně 3-cyklopentylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dionové formě **46**. Byly vyzkoušeny i jiné možnosti syntézy této látky, ovšem neúspěšně. Reakce buď to vůbec neproběhly, nebo vedly k zisku velmi nízkého výtěžku požadovaného produktu. Příklady nezdařených cyklizací vedoucích k tvorbě látky **46** jsou uvedeny níže (Tab. 11).



**Obrázek 18:** Látka **46** a její tautomerní forma **46a**.

**Tabulka 11:** Příklady neúspěšných reakčních postupů k látce **46**. Reakce byly provedeny v tlakové ampuli za inertizace dusíkem.

VL	Reaktant	Kyselina/Báze	Rozpouštědlo	Teplota	Čas	Produkt
<b>45</b> (1,0 eq.)	DEM (3,0 eq.)	-	Toluen (5 ml)	130 °C	24 h	Ne
<b>45</b> (1,0 eq.)	DEM (3,0 eq.)	Kys. octová (3 ml)	-	120°C	2 h	Ano (<10%)
<b>45</b> (1,0 eq.)	DEM (3,0 eq.)	Ethoxid sodný (1,2 eq.)	Ethanol (15 ml)	85 °C	4 h	Ano (<10%)

VL = výchozí látka; DEM = Diethylester kyseliny malonové

Látka **47** [164] byla připravena chlorací **46** v pozici C5 a C7, a to v tlakové ampuli za použití báze *N,N*-dimethylanilinu, chloračního činidla trichloridu fosforu a vhodných reakčních podmínek. Pro zisk požadovaného dichlor-derivátu bylo potřeba provést extrakci v dichlormethanu a surový produkt dále izolovat pomocí kolonové chromatografie. V rámci přípravy chlorovaného produktu **47** bylo odzkoušeno více reakčních postupů. Byly provedeny reakce za použití různých bází i bez báze, ovšem

ani v jednom případě nebyl získán požadovaný produkt. Výsledkem těchto reakcí byla směs vedlejších produktů, pravděpodobně včetně monochlorderivátu. Příklady neúspěšných chlorací jsou popsány níže ( Tab. 12).

**Tabulka 12 :** *Příklady neúspěšných reakčních postupů k látce 47.*

Výchozí látka	Chlorač. činidlo	Báze	Reakční nádoba	Teplota	Reakční doba	Produkt
<b>46</b> (1 eq.)	POCl <sub>3</sub> (6 eq.)	Pyridin (6 eq.)	Baňka, reflex	120 °C	1,5 h	Směs
<b>46</b> (1 eq.)	POCl <sub>3</sub> (6 eq.)	Triethylamin (6 eq.)	Tlak. ampule, inert. atm. N <sub>2</sub>	100 °C	22 h	vedlejších
<b>46</b> (1 eq.)	POCl <sub>3</sub> (6 eq.)	2,6-lutidin (6 eq.)	Tlak. ampule, inert. atm. N <sub>2</sub>	60 °C	2h	produktů
<b>46</b> (1 eq.)	POCl <sub>3</sub> (6 eq.)	-	Tlak. ampule, inert. atm. N <sub>2</sub>	100 °C	2 h	(mchd.)

mchd. = monochlorderivát

### 4.3 Syntéza klíčových prekurzorů – S<sub>N</sub> v poloze C7

Výchozí látkou pro přípravu látek **48-52** [4] byl dichlor-derivát **47**, jehož příprava je popsána výše. Reakce probíhaly za podmínek substituce nukleofilní v tlakové ampuli za bazické katalýzy *N,N*-diisopropyl-*N*-ethyleminem s použitím rozpouštědla *n*-propanolu. Pro získání čistých látek bylo nutné provést extrakci ethylacetátem, případně surové produkty následně přečistit kolonovou chromatografií.

### 4.4 Syntéza cílových prekurzorů – S<sub>N</sub> v poloze C5

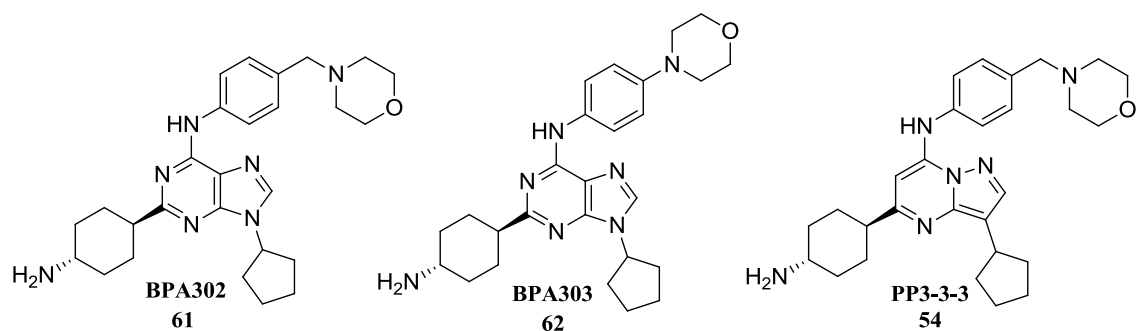
Všech 5 prekurzorů připravených za podmínek S<sub>N</sub> **48-52** bylo dále podrobeno substituci nukleofilní v pozici C5, kdy byl chlor nahrazen buď 4-aminocyklohexylamino, 4-aminobutylamino či (*R*)-(1-ethyl-2-hydroxyethyl)amino skupinou za vzniku cílových inhibitorů **53-60** [4]. Reakce probíhaly v tlakové ampuli v přítomnosti ethylenglykolu. Příprava látek vyžadovala vyšší teplotu, ale za to kratší reakční dobu než příprava prekurzorů za podmínek S<sub>N</sub> substituovaných v poloze C7. Pro získání čistých látek bylo nutné provést extrakci ethylacetátem a následně získané produkty ještě vyčistit na koloně. Nejvyšší výtěžek (94%) byl získán u látky **53** v 98% čistotě, naopak nejméně bylo vyizolováno látky **60** (15%) v 82% čistotě. Látku **57** s výtěžkem 20 % bylo nutné kvůli obtížnému dělení podrobit dvojímu čištění na kolonové chromatografii nejprve

s mobilní fází: chloroform:methanol – 9:1, poté ještě s mobilní fází: chloroform:metanol – 19:1. I přes to se podařilo získat tuto látku pouze v 70% čistotě.

#### 4.5 Výsledky studia biologické aktivity syntetizovaných sloučenin

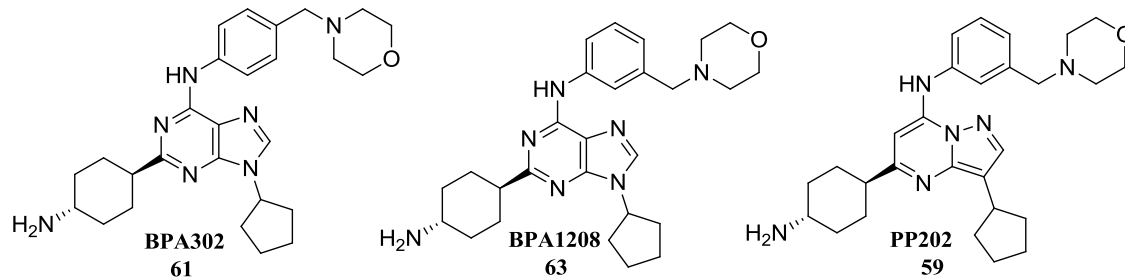
Část z připravených pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinových inhibitorů byla podrobena studiu vybraných biologických aktivit. Testování těchto látek jsem bohužel neprováděla já, ale Mgr. Eva Řezníčková, Ph.D. z Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR. V rámci zkoušek byla sledována inhibiční aktivita látek **PP9-3-3 (54)**, **PP202 (59)** a **PP201 (58)** zejména u CDK2, některých mutovaných forem FLT3 kináz, a také cytotoxicita u vybraných buněčných leukemických linií (MV4-11, K562 a EOL-1). Výsledky u zmíněných látek byly uvedeny v mikromolárních koncentracích a porovnány s významnými purinovými inhibitory ze série BPA. Ve své bakalářské práci jsem věnovala pozornost právě syntéze látek **BPA302 (61)** a **BPA303 (62)**, které projevíly jak významnou cytotoxickou, tak i CDK2 inhibiční aktivitu. Co se však týče nově připravených látek, nejsou tak účinné, jako již zmíněné purinové deriváty. Zajímavé hodnoty byly zaznamenány především u látky **PP9-3-3**, kde byla pozorována jen o řád nižší CDK2 a FLT3-WT inhibiční aktivita než u látky **BPA302**. Méně pozitivní však byly výsledky cytotoxicity této látky u uvedených leukemických linií. Meta-morfolinový derivát **PP202** oproti para-morfolinovému **PP9-3-3** vykazoval ve všech studovaných parametrech horší výsledky. Nejnižší aktivita ze zkoušených látek byla zjištěna u sloučeniny **PP201**, kde se hodnoty cytotoxicity i inhibice pohybovaly okolo 1 - 5  $\mu$ M. Biologické experimenty byly provedeny dle publikace Gucký, et al., 2013 [4]. Výsledky naměřených dat u zmíněných látek jsou uvedeny níže (Tab. 13, 14, 15). Hodnoty IC<sub>50</sub> byly získány ze 3 měření, jejichž směrodatná odchylka nepřevyšuje 15%.

**Tabulka 13:** Porovnání inhibiční aktivity a cytotoxicity u látek **BPA302**, **BPA303** a **PP9-3-3**.



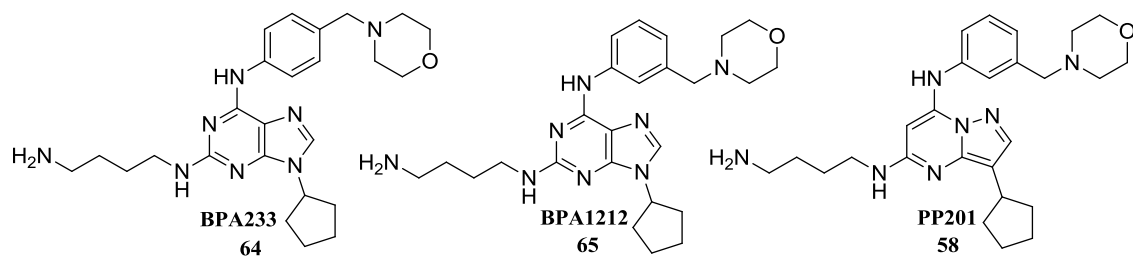
Číslo	Zkratka	MV4-11 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K562 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EOL-1 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	FLT3-WT IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CDK2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
61	BPA302	0,002	0,693	0,001	0,013	0,003	0,007
62	BPA303	0,002	0,965	0,008	0,021	0,002	0,017
54	PP3-3-3	0,227	1,046	0,201	0,048	-	0,022

Tabulka 14: Porovnání inhibiční aktivity a cytotoxicity u látek **BPA302**, **BPA1208** a **PP202**.



Číslo	Zkratka	MV4-11 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K562 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EOL-1 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	FLT3-WT IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	FLT3-ITD IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CDK2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
61	BPA302	0,002	0,965	0,001	0,021	0,002	0,007
63	BPA1208	0,017	1,329	0,023	0,012	-	0,030
59	PP202	0,464	3,625	0,521	0,073	-	0,117

Tabulka 15: Porovnání inhibiční aktivity a cytotoxicity u látek **BPA302**, **BPA1208** a **PP201**.



Číslo	Zkratka	MV4-11	K562	EOL-1	FLT3-WT	FLT3-ITD	CDK2
		GI <sub>50</sub> (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>64</b>	<b>BPA233</b>	0,011	2,095	0,041	0,006	0,001	0,923
<b>65</b>	<b>BPA1212</b>	0,038	8,400	0,049	0,022	-	1,691
<b>58</b>	<b>PP201</b>	1,018	4,580	1,355	1,433	-	3,948

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál a metody

Silikagel (Grace), TLC desky (Merck), rozpouštědla DMSO- $d_6$  (Sigma Aldrich), ostatní rozpouštědla (Lach-Ner), ostatní chemikálie (Sigma Aldrich).

Čistota meziproduktů a produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA). Vizualizace TLC byla sledována pod UV lampou (Camag) při vlnové délce  $\lambda$  254 nm nebo 366 nm. Čistění reakčních produktů bylo provedeno kolonovou chromatografií s využitím silikagelu zakoupeného u firmy Sigma Aldrich (o velikosti částic 230-400 mesh a velikosti pórů 60 Å). Pro odpaření rozpouštědel bylo použito vakuových odparek značky Heidolph Instruments. K vysušení některých produktů bylo využito sušárny značky Memmert (UF 55).

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla měřena na NMR spektrometru Jeol ECA 500 spektrometru při frekvenci 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO- $d_6$  a hodnoty chemických posunů byly zaznamenány v jednotkách ppm.

Analýza připravených látek byla provedena na plynovém chromatografu Shimadzu GCMS-QP2010 Plus. Byla použita kapilární kolona DB 5-MS (Agilent Technologies) [20 m, 0,18 mm, 25  $\mu\text{m}$ ], nosný plyn He, typ injektoru: splitless (teplota injektoru 250°C), bezděličové dávkování (1  $\mu\text{l}$ ) s teplotním programem: (60°C drženo 1 min; 20°C/min ramp do 260°C; 25°C/min ramp do 280°C, 280°C drženo 5 min).

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Polaris (ThermoScientific) s využitím elektronové ionizace EI (elektron impact), s ionizační energií 70 eV. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve full scan módu v rozmezí 50-500 m/z. HPLC analýza produktů byla provedena chromatografií na reverzní (C18) fázi [150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ] (Microsorb C18, Varian). Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanесeny na kolonu a oddělené složky byly vymyty lineárním methanolickým gradientem při průtoku 0,6 ml/min. Detekce byla provedena skenováním UV absorpance eluátu mezi 240 a 300 nm. Hmotnostní spektra byla změřena na hmotnostním spektrometru (Waters ZMD 2000) s využitím pozitivní

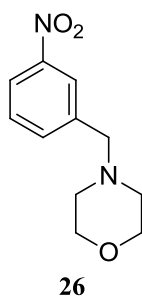


ionizace elektrosprejem. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve full scan módu v rozmezí  $m/z$  50-800 Da.

## 5.2 Syntéza prekurzorů aminu

### 5.2.1 Příprava 4-(3-nitrobenzyl)morfolinu **26** [165]

Do suché kulaté baňky byl přidán 3-nitrobenzylbromid **25** (9,26 mmol), morfolin (9,72 mmol), báze  $K_2CO_3$  (9,72 mmol) a rozpouštědlo ethanol (15 ml). Reakční směs byla následně zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě  $85^\circ C$  po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl ověřen pomocí TLC na silikagelu (s mobilní fází: hexan:ethylacetát – 3:1), poté byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs zfiltrována, pevná látka (KBr) byla promyta 3x5 ml ethanolu a filtrát následně odpařen na vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi ethylacetát (25 ml) a vodu (25 ml). Vodná fáze byla následně ještě protřepána 1 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO. Získaný produkt byl použit do následující reakce.



**Výtěžek:** 93 %

**Sumární vzorec:**  $C_{11}H_{14}N_2O_3$  (222,24)

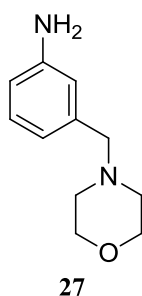
**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 59,45; H, 6,35; N, 12,60

**HPLC-MS (ESI+):** 223,56; **HPLC-UV:** (95 %)

### 5.2.2 Příprava 3-(morfolinomethyl)anilinu **27** [165]

4-(3-nitrobenzyl)morfolin **26** (8,55 mmol) byl vložen do dvojhrdlé kulaté baňky a rozpuštěn v ethanolu (40 ml). Dále byl přidán Raney nikl (~500 mg) a na baňku připevněn zpětný chladič. Do přikapávací nádoby bylo odebráno požadované množství 80% hydrazin hydrátu (40,0 mmol), nádoba s tímto roztokem byla nasazena na druhé hrdlo baňky a baňka byla následně zahřívána v olejové lázni na  $85^\circ C$ . Postupně a velmi

opatrně byl do reakční směsi přikapáván 80% hydrazin hydrát (aby nedošlo k bouřlivé reakci). Přibližně po 1 - 2 hodinách byla reakce ukončena. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC na silikagelu (s mobilní fází: hexan:ethylacetát - 3:1). Reakční směs byla následně zfiltrována přes křemelinu, katalyzátor Raney nikl promyt ethanolom (1 x 5 ml) a filtrát odpařen na RVO. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná fáze byla extrahována ještě 2 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO. Získaný produkt byl bez nutnosti čištění použit k substituci pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového jádra v pozici C7 za vzniku substancí **51** (viz podkapitola **5.4.4**).



**Výtěžek:** 99 %

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O(192,26)

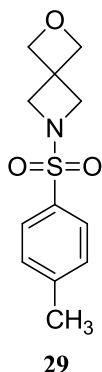
**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 68,72; H, 8,39; N, 14,57

**HPLC-MS (ESI+):** 193,81; **HPLC-UV:** (90 %)

### 5.2.3 Příprava *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **29** [166,167]

Směs *p*-tosylamidu **28** (80,6mmol), ethanolu (100 ml), hydroxidu draselného (215 mmol) a 3-bromo-2,2-bis(brommethyl)propan-1-olu (67,17 mmol) byla v kulaté baňce zahřívána na 80°C pod zpětným chladičem po dobu 90 hodin. Průběh reakce byl ověřen pomocí TLC na silikagelu (s mobilní fází: chloroform:methanol – 9:1), poté byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs odpařena na RVO. K bílému krystalickému odparku bylo následně přidáno 100 ml 2M roztoku KOH a směs byla dále ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 2 hodin. Poté byla reakční směs

zfiltrována a získaný pevný podíl byl konečně promýván vodou do odbarvení. Pevný produkt byl získán ve 100% čistotě, proto byl rovnou použit do další reakce.



**Výtěžek:** 56%

**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>S (253,32)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 56,90; H, 5,97; N, 5,53

**HPLC-MS (ESI+):** 254,39; HPLC-UV: (100 %)

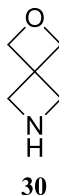
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,81 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 4,38 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 7,44 (d, *J*= 8,0, 2H, ArH); 7,64 (d, *J*=8.0; 2H, ArH).

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

#### 5.2.4 Příprava 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **30** [166]

Pro přípravu 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **30** bylo nutné provést deprotekcí *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **29**. Směs *N*-tosyl-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **29** (19,7 mmol), methanolu (680 ml) a práškového hořčíku (177,3 mmol) byla pod zpětných chladičem sonifikována při odhadované teplotě 40°C po dobu 3 hodin. Průběh deprotekcce byl kontrolován pomocí TLC na silikagelu (s mobilní fází: hexan:ethylacetát – 3:1). Po skončení reakce byla směs zfiltrována a filtrát vakuově odpařen. Dále byl tuhému bílému odparku přidán diethylether a připravený dekahydrát síranu sodného (15,1 síranu sodného + 19,1 ml vody) a tato směs byla za laboratorní teploty ponechána hodinu míchat. Poté byla pevná látka zfiltrována, filtrát ještě vysušen bezvodým síranem sodným a vakuově odpařen. Výsledkem zahuštění byla za laboratorní teploty

nepříliš stabilní sloučenina, proto ji bylo nutné použít ihned do další reakce, případně na krátkou dobu uchovat v mrazáku.



**Výtěžek:** 53 %

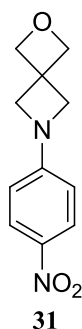
**Sumární vzorec:** C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO (99,13)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 60,58; H, 9,45; N, 14,13

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 3.51 (s, 4H); 4,54 (s, 4H).

### 5.2.5 Příprava 6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **31** [4]

Směs 2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptanu **30** (1,00 mmol), 4-nitro-1-fluorbenzenu (1,05 mmol), uhličitanu draselného (2,00 mmol) a absolutního etanolu (10 ml) byla v tlakové ampuli zahřívána na 100°C po dobu 4 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol – 19:1, detekce ninhydrinem), poté byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs vakuově odpařena a odparek byl následně rozdělen mezi vodu (25 ml) a dichlormethan (25 ml). Vodná fáze byla ještě podrobena extrakci 2 x 25 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a nakonec odpařeny na RVO. K odparku byl přidán ethylacetát (30 ml) a tato směs byla ponechána krystalovat do druhého dne v mrazáku při -20°C. Vzniklá žlutá krystalická látka byla zfiltrována, promyta ještě 2 x 5 ml vychlazeného ethylacetátu (0°C) a seškrábána do Petriho misky. Sušena byla volně na vzduchu, poté v sušárně (nejprve 30 minut při 60°C, poté 1,5 hodiny při 80°C). Suchá krystalická látka byla získána opět ve vysoké čistotě a použita rovnou do další reakce.



**Výtěžek:** 69 %

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (220,22)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 59,99; H, 5,49; N, 12,72

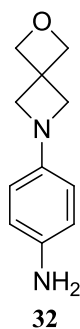
**HPLC-MS (ESI+):** 221,43; **HPLC-UV:** (99 %)

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

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

### 5.2.6 Příprava 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)aniline **32** [4]

6-(4-nitrofenyl)-2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan **31** (0,75 mmol) byl hydrogenován za atmosférického tlaku a laboratorní teploty v methanolu (50 ml) s 5% palladiem na aktivním uhlí (50 mg). Po spotřebě vodíku (50 ml) byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu, promyta methanolem a odpařena za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v 2M kyselině chlorovodíkové (50 ml) a vytřepán s dichlormethanem (25 ml). Vodná fáze byla poté neutralizována 5% hydrogenuhličitanem sodným. Vzniklá sraženina byla zfiltrována a promyta vodou. Surový produkt byl vysušen v exsikátoru a bez dalšího dělení podroben substituci pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinového jádra v pozici C7 za přípravy látky **52** (viz podkapitola **5.4.5**).



**Výtěžek:** 56 %

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O (190,24)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 59,99; H, 5,49; N, 12,72

**HPLC-MS (ESI+):** 191,52; **HPLC-UV:** (100 %)

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

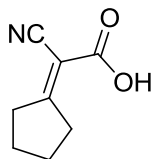
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 38,99; 62,04; 80,49; 113,30; 115,51; 140,93; 143,98.

### 5.3 Syntéza výchozích prekurzorů

#### 5.3.1 Příprava 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny **41** [160]

Do suché dvojhrdlé baňky byly postupně smíchány reaktanty: cyklopentanon **39** (126 mmol), kyanoctová kyselina **40** (126 mmol), octan amonný (19 mmol) a toluen (80 ml). Baňka s touto směsí byla umístěna do olejové lázně a opatřena nástavcem pro azeotropní destilaci. Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě 140 °C po dobu 2 až 3 hodin. Během reakce bylo sledováno množství zkondenzované vody (teoretický zisk vody činil 2,32 ml, skutečný objem byl 2,30 ml). Průběh reakce byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC), za použití mobilní fáze: toluen : dioxan:kyselina octová – 17:3:1. Po skončení reakce byla směs ochlazena nejprve na laboratorní teplotu, poté byla umístěna do mrazáku (-5 °C) na 30 minut. Tímto ochlazením se vytvořily krystaly, které byly následně zfiltrány na fritě a promyty vychlazeným toluenem (3 x 10 ml). Získané krystaly byly z frity seškrábány do Petriho misky a zváženy. Mokrý produkt byl následně umístěn do sušárny, kde byl

při 60°C sušen do následujícího dne. Nakonec byl vysušený produkt opět zvážen a použit do další reakce.



41

**Výtěžek:** 55 %

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> (151,17)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 63,56; H, 6,00; N, 9,27

**HPLC-MS (ESI+):** 152,31; **HPLC-UV:** (100 %)

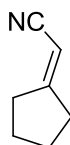
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,64–1,74 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,65–2,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,83–2,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,15; 26,59; 35,51; 37,67; 101,82; 116,97; 163,62; 186,48.

### 5.3.2 Příprava 2-cyklopentylidenacetonitrilu 42

Do vysušené kulaté baňky byla přidána 2-kyano-2-cyklopentylidenoctová kyselina **41** (76,1 mmol), prášková měď (7,61 mmol) a ethylenglykol (70 ml). Reakční směs byla umístěna do olejové lázně a k baňce byl připojen zpětný chladič. Tato směs byla poté míchána při teplotě 160 °C po dobu 2 hodin. Po ověření průběhu reakce metodou tenkovrstevné chromatografie (s použitím mobilní fáze: ethylacetát:hexan – 1:1 a detekcí manganistanem draselným) byla reakce ukončena. Reakční směs byla ponechána ochlazení na laboratorní teplotu, zfiltrována přes křemelinu a promyta ethylacetátem (3 x 10 ml). K filtrátu byla přidána destilovaná voda (350 ml) a ethylacetát (150 ml). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla dále extrahována 3 x 100 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodným síranem sodným, zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce (RVO). Suchý odparek byl zvážen a použit do následující reakce.





42

**Výtěžek:** 85 %

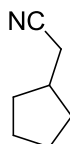
**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N (107,15)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 78,46; H, 8,47; N, 13,07

**GC-MS (EI, M+ (rel.int. m/z)):** Rt = 4,79; 67 (100); 107 (24); 78,95 (18); 65,95 (12); 76,95 (10).

### 5.3.3 Příprava 2-cyklopentylacetonitrilu 43 [161]

Do suché Erlenmeyerovy baňky byl přidán 2-cyklopentylidenacetonitril **42** (86,6 mmol) a methanol (150 ml). Reakční směs byla po dobu 5 minut inertizována dusíkem. Poté bylo k reakční směsi přidáno 10% paladium na aktivním uhlí (1 mol %). Hydrogenace probíhala za stálého míchání a její průběh byl kontrolován na základě spotřeby plynného vodíku. Teoretická spotřeba vodíku činila 1,94 l. Po ukončení reakce byla reakční směs inertizována dusíkem, poté zfiltrována přes křemelinu, promyta methanolem (3 x 10 ml) a vakuově odpařena na RVO. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (s mobilní fází: chloroform:metanol – 19:1), produkt reakce zvážen a použit do dalšího kroku reakce.



43

**Výtěžek:** 84 %

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N (109,17)

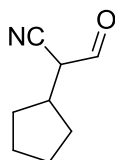
**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 77,01; H, 10,16; N, 12,83

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,14–1,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,43–1,52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,53–1,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,71–1,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,06 (sep, *J*=7,0, 1H, CH); 2,48 (d, *J*=6,5, 2H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 22,16; 25,12; 31,97; 36,16; 63,2; 120,69.

#### 5.3.4 Příprava 2-cyklopentyl-3-oxopropannitrilu **44** [162]

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán tetrahydrofuran (100 ml). Baňka byla umístěna do chladicí lázně s ethanolem a rozpouštědlo bylo pomocí suchého ledu ochlazen na -78 °C a krátce inertizováno dusíkem. Teplota byla kontrolována rtuťovým teploměrem. Za stálého míchání byl do baňky postupně přidán 2M roztok lithia diisopropylamidu (LDA) (64,22 mmol). Reakční směs byla ponechána míchat 20 minut při teplotě okolo -78 °C, poté byl pomocí přikapávací nálevky postupně přidán 2-cyklopentylacetonitril **43** (47,56 mmol) rozpuštěný v tetrahydrofuranu (50 ml). Reakční směs byla ponechána míchat při teplotě -78 °C po dobu 20 minut. Následně byl k reakční směsi pomocí přikapávací nálevky postupně přidán ethylformiát (57,07 mmol) smíchaný s tetrahydrofuranem (50 ml). Reakční směs se nechala míchat při teplotě -78 °C po dobu 45 minut a poté byla ponechána za stálého míchání ohřát na laboratorní teplotu do následujícího dne. Druhý den byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (s mobilní fází: petrolether:ethylacetát – 3:1 a detekcí manganistanem draselným). Rozpouštědlo bylo z reakční směsi odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparky byl poté přidán ethylacetát (100 ml). Následně byl tento roztok umístěn do chladicí lázně a ochlazen na -5 °C. Za stálého míchání a chlazení byl k roztoku postupně přidán 5% roztok hydrogenuhličitanu sodného (100 ml). Tato reakční směs byla ponechána míchat 20 minut při teplotě okolo -5 °C. Následně byla oddělena organická fáze pomocí dělicí nálevky. Vodná fáze byla poté extrahována ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným, zfiltrvány a odpařeny na RVO. Vysušený produkt byl zvážen a použit do následující reakce.



44

**Výtěžek:** 81 %

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO (137,18)

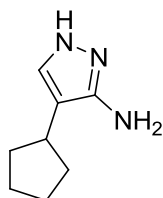
**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 70,04; H, 8,08; N, 10,21

### 5.3.5 Příprava 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-3-aminu 45 [163]

Do suché kulaté baňky byl přidán 2-cyklopentyl-3-oxopropanitril **44** (54,0 mmol) a ethanol (30 ml). Roztok byl ponechán míchat za laboratorní teploty, dokud se 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitril v rozpouštědle zcela nerozpustil. Poté byl k roztoku postupně přidán 80% vodný roztok hydrazin hydrátu (323,0 mmol), a ten byl opět ponechán míchat 20 minut za laboratorní teploty. Následně byla přidána kyselina octová (540,0 mmol), reakční směs byla přelita do tlakové ampule, krátce profouknuta dusíkem, poté umístěna do olejové lázně vyhřáté na teplotu 100 °C a ponechána reagovat 36 hodin. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (s mobilní fází: chloroform:metanol - 19:1 a detekován ninhydrinem). Po skončení reakce byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu, přelita do baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. K odparku byla přidána destilovaná voda (150 ml). Dále bylo nutné provést kontrolu hodnoty pH pomocí indikátorových pH papírků, jehož hodnota by měla být 6 - 7. Reakční směs byla následně extrahována ethylacetátem (3 x 150 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodným síranem sodným, zfiltrvány a odpařeny s využitím vakuové odparky.

Následně bylo potřeba surový produkt oddělit od vedlejších produktů acidobazickou extrakcí. Produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu (100 ml). K roztoku byla přidána 1M kyselina chlorovodíková (100 ml) a poté bylo zkontrolováno pH, jehož hodnota by neměla být vyšší než 2. Roztok byl ponechán míchat 5 minut za laboratorní teploty. Dále byla pomocí dělicí nálevky oddělena organická fáze. Vodná fáze byla protřepána s ethylacetátem (1 x 100 ml) a organická fáze byla opět oddělena. Následně

byla vodná fáze neutralizována přidavkem 1M hydroxidu sodného (110 ml) za kontroly hodnoty pH, jejíž hodnota pH by neměla být vyšší než 7. Dále byla vodná fáze opět extrahována ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodým síranem sodným, zfiltrány a odpařeny na RVO. Čistota produktu byla zkontrolována metodou TLC (s mobilní fází: chloroform:metanol – 19:1 a detekována ninhydrinem). Produkt byl následně čištěn pomocí kolonové chromatografie (s mobilní fází: chloroform:metanol – 19:1; silikagel 95 g). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a pomocí vakuové odpary odpařeny. Vysušený produkt byl zvážen a použit do dalších reakcí.



45

**Výtěžek:** 90 %

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub> (151,21)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 63,54; H, 8,67; N, 27,79

**HPLC-MS (ESI+):** 152,35; **HPLC-UV:** (98 %)

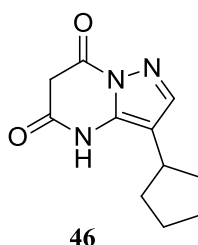
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,28-1,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,46-1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,59-1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,83-1,90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,63-2,70 (m, 1H, CH); 4,22 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 7,05 (s, 0,58H, CH); 7,06 (s(br), 0,42H, CH); 11,10 (s(br), 1H, NH).

### 5.3.6 Příprava 3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3,5-(4*H*,6*H*)-dionu 46 [164]

Nejprve byl připraven ethoxid sodný. Do vysušené dvouhrbé baňky byl nalit absolutní ethanol (20 ml), na hlavní hrdlo baňky byl nasazen zpětný chladič opatřený chlorkalciovým uzávěrem a druhé hrdlo bylo uzavřeno zátkou. Baňka byla vložena do chladicí lázně s ethanolem. Poté byl z lahve s petroletherem vytažen hranolek sodíku na filtrační papír, kousek z něj byl odříznut a následně zbaven

zoxidované části. Na Petriho misce bylo naváženo požadované množství nezoxidovaného sodíku (13,04 mmol), které bylo následně vloženo bočním hrdlem baňky do etanolu. Baňka byla opět zazátkována, aby nedocházelo u rozpouštědla k pohlcení vzdušné vlhkosti. Za stálého míchání a chlazení suchým ledem byl sodík během 45 minut v absolutním ethanolu rozpuštěn za vzniku požadovaného ethoxidu sodného.

Do tlakové ampule byl přidán 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-3-amin **45** (6,52mmol), připravený ethoxid sodný a diethylester kyseliny malonové (7,17mmol). Reakční směs byla v dusíkové atmosféře zahřívána na 80°C po dobu 6,5 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie (s mobilní fází: chloroform:methanol – 19:1). Po ukončení reakce byl roztok ponechán ochlazení na laboratorní teplotu, následně zfiltrován, promyt trochou ethanolu a rozpuštěn ve vodě (5 ml). Následně bylo pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové za chlazení na ledové lázni upraveno pH na hodnotu 1 - 2, což dalo vznik lehce nažloutlé sraženině. Tato sraženina byla poté zfiltrována, promyta vodou a ponechána sušit na vzduchu do druhého dne. Konečně byl pevný produkt ještě 2 hodiny sušen v sušárně při teplotě 60°C. Takto vysušená pevná bílá látka byla zvážena a bez čištění použita do následující reakce.



**Výtěžek:** 62 %

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (219,24)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 60,26; H, 5,98; N, 19,17

**HPLC-MS (ESI+):** 220,45; **HPLC-UV:** (100 %)

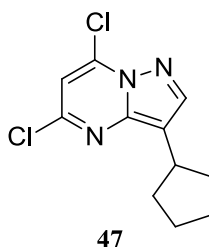
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,35-1,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,5-1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,65-1,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,82-1,95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,94 (qui, *J*=8,5, 1H, CH); 3,02 (qui, *J*=8,5, 1H, CH); 3,13 (s(br), 1H, OH); 3,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,86 (s, 1H, CH); 7,63 (s, 1H, CH); 7,27 (s, 1H, CH); 11,32 (s, 1H, NH); 11,98 (s(br), 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25,10; 25,22; 33,02; 33,56; 33,70; 41,42; 76,65; 109,37; 138,82; 140,23; 145,65; 160,99; 161,35; 164,67; 166,02.

### 5.3.7 Příprava 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu 47 [164]

Do suché tlakové ampule byl vložen 3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3,5-(4*H*,6*H*)-dion **46** (4,04 mmol), báze *N,N*-dimethylanilin (11,32 mmol) a vychlazený trichlorid fosforylu (11 ml). Reakční směs byla nejprve 10 minut míchána za laboratorní teploty, poté zahřívána na 100°C v atmosféře dusíku po dobu 6,5 hodiny. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (s mobilní fází: chloroform: metanol – 19:1). Po skončení reakce byla směs přelita do kulaté baňky, tlaková ampule vypláchnuta toluenem a reakční směs odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (40 ml), nalit do ledové tříště (cca 100 ml) a ponechán míchat 15 minut. Poté bylo přidávkem pevného hydrogenuhličitanu sodného upraveno pH na hodnotu 7-8. Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla extrahována ještě dichlormethanem (2 x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (3 x 50 ml), vysušeny bezvodým síranem hořečnatým a odpařeny za pomoci rotační vakuové odparky.

Získaný produkt bylo nutné přečistit kolonovou chromatografií (mobilní fáze: chloroform:methanol – 19:1, silikagel 95 g). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a pomocí vakuové odparky odpařeny. Čistý produkt byl následně podroben další reakci.



**Výtěžek:** 59 %

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (256,13)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 51,58; H, 4,33; N, 16,41

**HPLC-MS (ESI+):** 257,4; **HPLC-UV:** (98%)

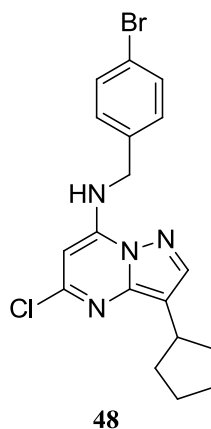
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1,58-1,69 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,70-1,79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,97-2,04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,18 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 3,30 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,53 (s, 1H, ArH); 8,27 (s, 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 25,2; 33,85; 34,93; 108,51; 116,49; 140,12; 144,82; 144,93; 147,74.

## 5.4 Syntéza klíčových prekurzorů

### 5.4.1 Příprava *N*-(4-brombenzyl)-5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **48** [4]

Směs 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **47** (0,77mmol), 4-bromobenzylamin hydrochloridu **33** (0,77mmol) a *N*-ethyl-*N,N*-diisopropylaminu (3,08 mmol) v *n*-propanolu (3 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 100 °C po dobu 21 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s mobilní fází:chloroform:methanol – 19:1) byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Získaný produkt byl zvážen a bez dalšího čištění podroben další reakci za přípravy látky **53** (viz podkapitola 5.5.1).



**Výtěžek:** 86 %

**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>BrClN<sub>4</sub> (405,72)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 53,29; H, 4,47; N, 13,81

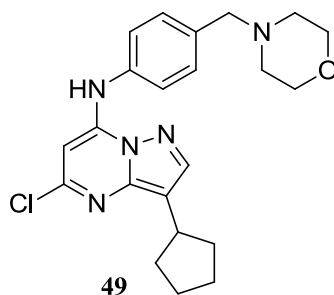
**HPLC-MS (ESI+):** 407,49; **HPLC-UV:** (99 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,52-1,64 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,66-1,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,92-1,99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,05-3,12 (qui, *J*=7,0, 1H, CH); 4,55-4,57 (d, *J*=6,0, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,05 (s, 1H, ArH); 7,30-7,32 (d, *J*=10,0, 2H, ArH); 7,49-7,51 (d, *J*=10,0, 2H, ArH); 8,02 (s, 1H, ArH); 8,91 (t, *J*=6,0, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,16; 33,86; 34,79; 84,39; 112,89; 113,32; 120,84; 129,83; 131,93; 137,85; 142,72; 144,73; 147,80; 149,70.

#### 5.4.2 Příprava 5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **49** [4]

Směs 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **47** (0,39 mmol), 4-(morfolin-4-yl-methyl)anilinu **34** (0,45 mmol) a *N*-ethyl-*N,N*-diisopropylaminu (1,17 mmol) v *n*-propanolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 110 °C po dobu 17 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (s mobilní fází: toluen:ethylacetát - 1:1) byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Získaný produkt byl následně podroben čištění pomocí kolonové chromatografie (s mobilní fází: toluen:ethylacetát – 1:1; silikagel 30 g). Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Čistý produkt byl zvážen a použit pro přípravu molekul **54** a **55** (viz podkapitoly 5.5.2 a 5.5.3).





**Výtěžek:** 76%

**Sumární vzorec:** C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>O (411,93)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 64,15; H, 6,36; N, 17,00; Nalezeno: C, 61,87; H, 5,71; N, 14,51

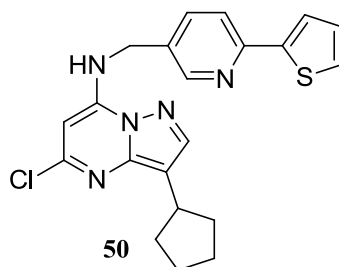
**HPLC-MS (ESI+):** 412,81; **HPLC-UV:** (92 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,60-1,68 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,71-1,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,96-2,02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,32-2,36 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3,11-3,17 (qui, *J*=7,0, 1H, CH); 3,44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,54-3,56 (m, *J*=5, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5,99 (s, 1H, ArH); 7,34-7,38 (m, 4H, 4xArH); 8,10 (s, 1H, ArH); 10,22 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,20; 33,88; 34,83; 53,71; 62,48; 66,74; 85,40; 113,67; 125,15; 130,58; 135,94; 136,48; 143,0; 144,98; 146,68; 149,60.

#### 5.4.3 Příprava **5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu 50** [4]

Směs 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **47** (0,39 mmol), (6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methylamin dihydrochloridu **35** (0,43 mmol) a *N*-ethyl-*N,N*-diisopropylaminu (1,17 mmol) v *n*-propanolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 110 °C po dobu 20 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (s mobilní fází: petrolether:ethylacetát - 3:1) byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Získaný produkt byl podroben čištění s využitím kolonové chromatografie (s mobilní fází: petrolether:ethylacetát – 3:1; silikagel 40 g). Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Čistý produkt byl zvážen a použit k přípravě sloučenin **56** a **57** (viz podkapitola 5.5.4 a 5.5.5).



**Výtěžek:** 74 %

**Sumární vzorec:** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>5</sub>S (409,93)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 61,53; H, 4,92; N, 17,08

**HPLC-MS (ESI+):** 410,75; **HPLC-UV:** (100 %)

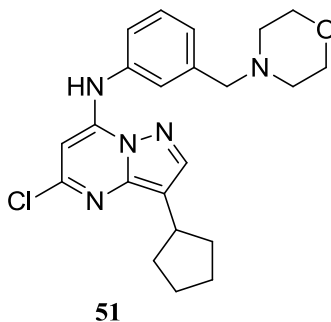
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,57-1,64 (m, 4H); 1,69-1,75 (m, 2H); 1,92-1,98 (m, 2H); 3,09 (qui, *J*=7,0, 1H, CH); 4,62 (d, *J*=6,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 6,20 (s, 1H, CH); 7,11 (dd, *J*=8,5, *J*'=3,5, 1H, ArH); 7,58 (dd, *J*=5,0, *J*'=1,0, 1H, ArH); 7,71 (dd, *J*=5,0, *J*'=1,0, 1H, ArH); 7,80 (dd, *J*=8,0, *J*'=2,0, 1H, ArH); 7,85 (dd, *J*=8,5, *J*'=1,0, 1H, ArH); 8,02 (s, 1H, ArH); 8,93 (t, *J*=6,5, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,16; 33,86; 34,80; 42,42; 60,29; 84,49; 113,34; 118,92; 125,70; 128,85; 128,93; 132,47; 136,64; 142,71; 144,68; 147,65; 149,06; 149,69; 151,42.

#### 5.4.4 Příprava 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-(3-(morfolinomethyl)fenyl) pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **51** [4]

Směs 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **47** (0,39mmol), 3-(morfolinomethyl)anilinu **27** (0,47mmol) a *N*-ethyl-*N,N*-diisopropylaminu (1,17mmol) v *n*-propanolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 115 °C po dobu 21 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (s mobilnífází: toluen:ethylacetát - 1:1) byla reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za

sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt bylčištěn pomocí kolonové chromatografie (s mobilní fází: toluen:ethylacetát – 1:1; silikagel 45 g). Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Čistý produkt byl zvážen a použit do dalších 2 reakcí k přípravě látek **58** a **59** (viz podkapitola **5.5.6** a **5.5.7**).



**Výtěžek:** 81 %

**Sumární vzorec:** C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>O (411,93)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 64,15; H, 6,36; N, 17,00; Nalezeno: C, 62,51; H, 5,77; N, 15,59

**HPLC-MS (ESI+):** 412,73; **HPLC-UV:** (99 %)

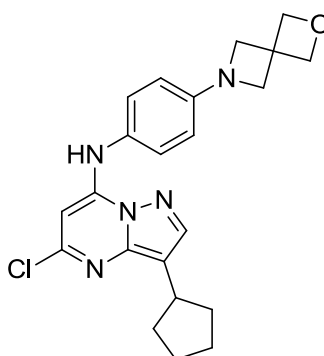
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,58-1,68 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,71-1,78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,96-2,03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,30-2,38 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3,11-3,17 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 3,48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,54-3,56 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 6,00 (s, 1H, ArH); 7,18-7,21 (m, 1H, ArH), 7,27-7,32 (m, 1H, ArH); 7,37-7,40 (m, 2H, 2xArH); 8,10 (s, 1H, ArH); 10,24 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,28; 33,74; 34,96; 53,63; 62,26; 66,77; 85,45; 113,85; 123,74; 125,22; 127,17; 129,88; 137,15; 140,05; 142,93; 145,05; 146,75; 149,69.

#### 5.4.5 Příprava *N*-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **52** [4]

Směs 5,7-dichlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **47** (0,20 mmol), 4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]hept-6-yl)anilinu **32** (0,23 mmol) a *N*-ethyl-*N,N*-diisopropylaminu (0,60 mmol) v *n*-propanolu (2 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 22 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol – 19:1) byla

reakce ukončena. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozdělen mezi vodu (25 ml) a ethylacetát (25 ml). Vodná vrstva byla ještě 2 x extrahována 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Získaný produkt byl podroben čištění s využitím kolonové chromatografie (s mobilní fází: chloroform:methanol – 19:1; silikagel 35 g). Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Čistý produkt byl zvážen a použit pro přípravu substance **60** (viz podkapitola 5.5.8).



52

**Výtěžek:** 79 %

**Sumární vzorec:** C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>O (409,91)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 64,46; H, 5,90; N, 17,09

**HPLC-MS (ESI+):** 410,72; **HPLC-UV:** (99 %)

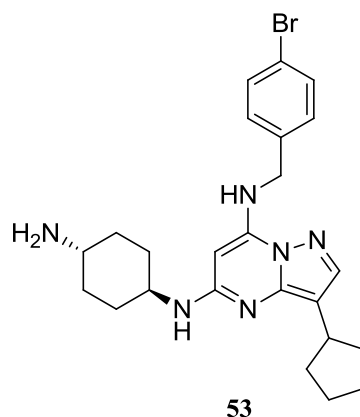
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,57-1,66 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,69-1,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,93-2,01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,09-3,15 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 3,95-3,99 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 4,68-4,70 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5,68 (s, 1H, ArH); 6,47-6,49 (d, *J*=9,00, 2H, 2xArH); 7,16-7,17 (d, *J*=8,5, 2H, 2xArH); 8,06 (s, 1H, ArH); 9,95 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,18; 33,96; 34,83; 38,84; 61,80; 80,44; 84,82; 112,73; 113,55; 126,38; 127,06; 142,93; 145,04; 147,66; 149,51; 150,72.

## 5.5 Syntéza cílových prekurzorů

### 5.5.1 Příprava $N^5$ -((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)- $N^7$ -(4-brombenzyl)-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **53** [4]

Směs  $N$ -(4-brombenzyl)-5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **48** (0,24 mmol), *trans*-1,4-diaminocyklohexanu **36** (2,4 mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 9:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (40 g) (s použitím mobilní fáze o složení: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného - 9:1:0,05). Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Izolovaný produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 94%

**Sumární vzorec:** C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>BrN<sub>6</sub> (483,45)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 59,63; H, 6,46; N, 17,38; Nalezeno: C, 56,05; H, 6,71; N, 15,35

**HPLC-MS (ESI+):** 485,77; **HPLC-UV:** (98%)

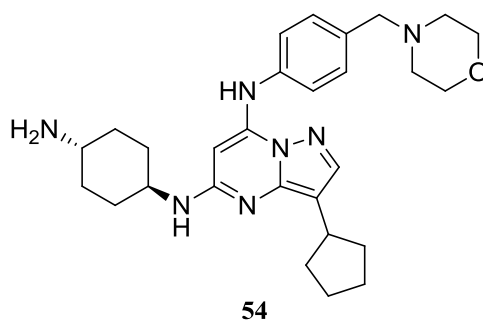
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,08-1,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,26-1,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,54-1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,62-1,74 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,84-1,96 (m, 7H, 3xCH<sub>2</sub>, 1xCH); 2,82-2,88 (m,

1H, CH); 2,93-3,00 (qui,  $J=8,0$ , 1H, CH); 3,36-4,37(d,  $J=6,5$ , 2H, CH<sub>2</sub>); 4,97 (s, 1H, ArH); 6,44-6,46 (d,  $J=7,0$ , 1H, NH); 7,25-7,27 (d,  $J=8,5$ , 2H, 2xArH); 7,48-7,50 (d,  $J=8,00$ , 2H, 2xArH); 7,57 (s, 1H, ArH); 7,79-7,82 (t,  $J=6,5$ , 1H, NH).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 22,55; 30,85; 33,48; 35,36; 44,62; 49,59; 108,63; 120,45; 129,40; 131,84; 138,62; 146,01; 146,68; 156,18.

### 5.5.2 Příprava *N*<sup>5</sup>-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-*N*<sup>7</sup>-(4-morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **54** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-(4-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **49** (0,12 mmol), trans-1,4-diaminocyklohexanu **36** (2,4 mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí tenkovrstevné chromatografie na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (35 g) s mobilní fází: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného - 4:1:0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Čistý produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 59 %

**Sumární vzorec:** C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O (489,66)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 68,68; H, 8,03; N, 20,02; Nalezeno: C, 60,74; H, 6,93; N, 17,14

**HPLC-MS (ESI+):** 490,72; **HPLC-UV:** (100 %)

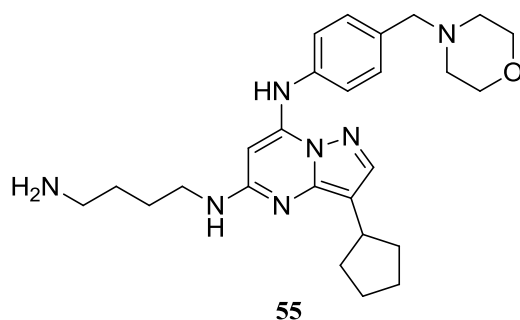
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,91-1,98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,98-2,20 (m, 1H, CH); 2,11-2,19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,35-2,43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,47-2,58 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,72-2,76 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,81-2,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,10-3,18 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3,65-3,72 (m, 1H, CH); 3,83 (qui, *J*=8,5, 1H, CH); 4,22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,35-4,37 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 4,44 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 6,40 (s, 1H, CH); 7,46 (d, *J*=7,5, NH); 8,08-8,12 (m, 4H, ArH); 8,44 (s, 1H, CH); 9,79 (s(br), 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 26,19; 31,47; 34,30; 36,24; 49,36; 50,50; 54,48; 56,29; 63,29; 67,55; 81,28; 110,0; 124,53; 131,09; 135,24; 138,49; 141,94; 145,78; 147,40; 156,8.

### 5.5.3 Příprava

#### *N*<sup>5</sup>-(5-aminobutyl)-3-cyklopentyl-*N*<sup>7</sup>-(4-morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **55** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-(4-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **49** (0,12 mmol), putrescinu **37** (2,4 mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (35 g) s mobilní fází:chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného - 3:1:0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Izolovaný produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 34 %

**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O (463,62)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 67,36; H, 8,04; N, 21,15; Nalezeno: C, 58,98; H, 6,62; N, 17,62

**HPLC-MS (ESI+):** 466,00; **HPLC-UV:** (100 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,50-1,53 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH); 1,55-1,67 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH); 1,69-1,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,67-1,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,92-1,97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,33 (bs, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,68-2,73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,02 (qui, *J*=7.5, 1H, CH); 3,20-3,23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

3,41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,54-3,55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5.60 (s, 1H, ArH); 6,75-6,77 (t, *J*=5.00, 1H, NH); 7,29 (s, 4H, 4xArH); 7,64 (s, 1H, ArH).

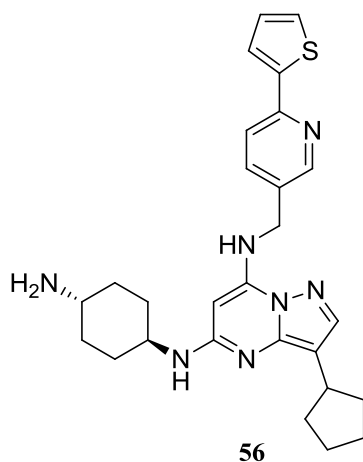
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,35; 26,42; 26,56; 33,77; 35,22; 53,73; 62,48; 66,74; 109,09; 123,76; 130,23; 134,36; 137,83; 140,92; 144,80; 146,81; 157,0.

#### 5.5.4 Příprava *N*<sup>5</sup>-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl-*N*<sup>7</sup>-(((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **56** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-(((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **50** (0,1 mmol), trans-1,4-diaminocyklohexanu **36** (2,0 mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:metanol :konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny



bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (35 g) s mobilní fází: chloroform:metanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného - 4 : 1 : 0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Čistý produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 60 %

**Sumární vzorec:** C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>S (487,66)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 66,50; H, 6,82; N, 20,11; Nalezeno: C, 57,97; H, 6,74; N, 17,21

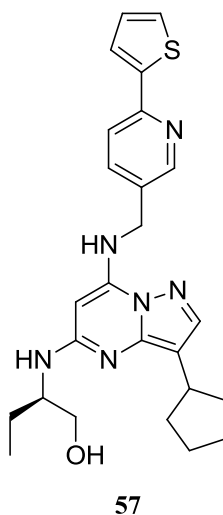
**HPLC-MS (ESI+):** 489,04; **HPLC-UV:** (100%)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,09-1,19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,31-1,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,54-1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,63-1,72 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,86-1,92 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,97-1,99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,87-2,93 (m, 1H, CH); 2,97 (qui, *J*=8,0, 1H, CH); 3,57 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 4,41 (d, *J*=6,0, 2H, CH<sub>2</sub>); 5,09 (s, 1H, CH); 6,49 (d, *J*=7,0, 1H, NH); 7,11 (dd, *J*=8,5, *J'*=2,5, 1H, ArH); 7,57-7,58 (m, 2H, ArH); 7,71 (dd, *J*=3,5, *J'*=1,5, 1H, ArH); 7,75 (dd, *J*=8,5, *J'*=2,5, 1H, ArH); 7,85 (d, *J*=8,0, 1H, ArH); 8,49 (d, *J*=1,5, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,55; 30,02; 30,55; 33,47; 35,29; 42,68; 48,70; 49,38; 119,05; 125,65; 128,75; 128,93; 133,13; 136,40; 138,19; 141,13; 144,86; 146,20; 146,39; 150,02; 151,35; 156,02.

**5.5.5 Příprava** **(*R*)-2-((3-cyklopentyl-7-(((6-thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)amino)pyrazolo[1,5-*a*]pirimidin-5-yl)amino)butan-1-olu 57** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-((6-(thiofen-2-yl)pyridin-3-yl)methyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **50** (0,12 mmol), (*R*)-2-aminobutan-1-olu **38** (2,4mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (35 g) nejprve s mobilní fází: chloroform:metanol - 9:1, poté s mobilní fází: chloroform:methanol – 19:1. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na RVO. Izolovaný produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 20 %

**Sumární vzorec:** C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>OS (462,61)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 64,91; H, 6,54; N, 18,17; Nalezeno: C, 61,98; H, 5,98; N, 13,66

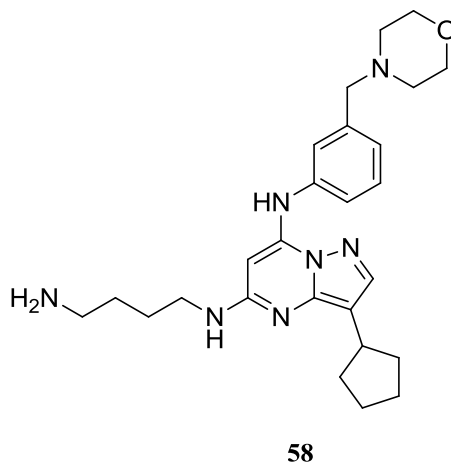
**HPLC-MS (ESI+):** 463,90; **HPLC-UV:** (70 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 0,80 (t, *J*=7,5, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,52-1,64 (m, 6H); 1,66-1,74 (m, 2H), 1,87-1,98 (m, 2H); 2,95 (qui, *J*=7,0, 1H, CH); 4,40 (q, *J*=7,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,31-3,42 (m, 1H); 3,77 (s(br), 1H, OH); 5,21 (s, 1H, CH); 7,57-7,58 (m, 2H, ArH); 7,71 (dd, *J*=3,5,

$J'=1,5$ , 1H, ArH); 7,75 (dd,  $J=8,5$ ,  $J'=2,5$ , 1H, ArH); 7,85 (d,  $J=8,0$ , 1H, ArH); 7,91 (dd,  $J=8,5$ ,  $J'=2,5$ , 1H, ArH); 8,51 (d,  $J=1,5$ , 1H, NH).

#### 5.5.6 Příprava $N^5$ -(5-aminobutyl)-3-cyklopentyl- $N^7$ -(3-morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **58** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl- $N$ -(3-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **51** (0,12 mmol), putrescinu **37** (2,43mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (25 g) nejprve s mobilní fází: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 3:1:0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Čistý produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 54 %

**Sumární vzorec:** C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O (463,62)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 67,36; H, 8,04; N, 21,15; Nalezeno: C, 54,72; H, 6,15; N, 2,30

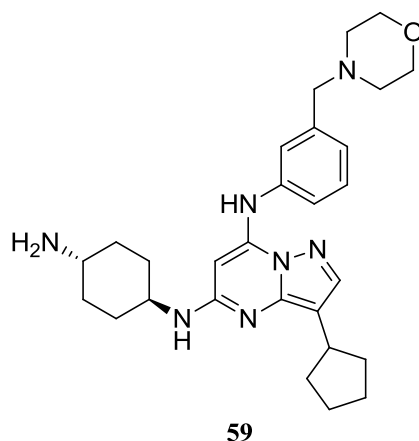
**HPLC-MS (ESI+):** 464,69; **HPLC-UV:** (99 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,37 (qui, *J*=7,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,49 (qui, *J*=7,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,57-1,68 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,69-1,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,92-1,96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,30-2,38 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,53 (t, *J*=7,0, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,02 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 3,21 (q, *J*=5,5, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,53-3,55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5,58 (s, 1H, CH); 6,70 (t, *J*=5,5, 1H, NH); 7,07 (d, *J*=8,0, 1H, ArH); 7,24 (d, *J*=9,0, 1H, ArH); 7,28 (s, 1H, ArH); 7,64 (s, 1H, CH).

**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 25,35; 26,94; 30,80; 33,60; 35,17; 41,69; 53,69; 62,69; 66,75; 70,32; 75,06; 109,00; 122,41; 124,16; 125,37; 129,52; 138,85; 139,79; 140,84; 144,68; 146,73; 157,09.

### 5.5.7 Příprava *N*<sup>5</sup>-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl-*N*<sup>7</sup>-(3-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **59** [4]

Směs 5-chlor-3-cyklopentyl-*N*-(3-(morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **51** (0,12 mmol), trans-1,4-diaminocyklohexanu **36** (2,43mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4 :1 : 0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (30 g) nejprve s mobilní fází: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 3:1:0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Izolovaný produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 76 %

**Sumární vzorec:** C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O (489,66)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 68,68; H, 8,03; N, 20,02; Nalezeno: C, 61,77; H, 8,15; N, 16,27

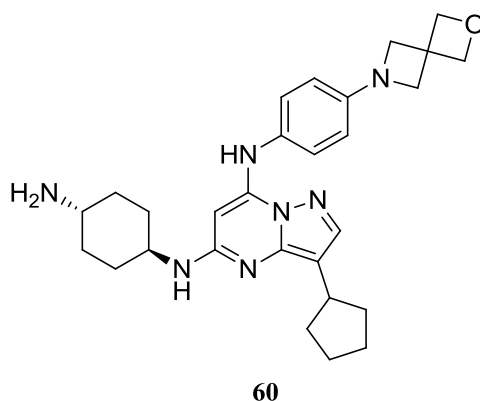
**HPLC-MS (ESI+):** 490,74; **HPLC-UV:** (100 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,10-1,22 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH); 1,25-1,39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,54-1,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,65-1,77 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,85-1,97 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,98-2,05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,84 -2,90 (m, *J*=8,5, 1H, CH); 2,98-3,04 (qui, *J*=7,5, 1H, CH); 3,44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,53-3,55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 3,62 (s(br), 2H, NH<sub>2</sub>); 3,86 (bs, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5,55 (s, 1H, ArH); 6,61-6,63 (d, *J*=7,0, 1H, ArH); 7,07-7,09 (d, *J*=7,5, 1H, ArH); 7,22-7,24 (d, *J*=8,0, 1H, ArH); 7,27 (t, *J*=2,0, 1H, ArH); 7,31-7,34 (t, *J*=7,5, 1H, ArH); 7,63 (s, 1H, NH).

#### 5.5.8 Příprava *N*<sup>7</sup>-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-*N*<sup>5</sup>-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diaminu **60** [4]

Směs *N*-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-5-chlor-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-aminu **52** (0,12 mmol), *trans*-1,4-diaminocyklohexanu **36** (2,4mmol) a ethylenglykolu (1,5 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160°C po dobu 4 hodin. Po ověření průběhu reakce pomocí TLC na silikagelu (s použitím mobilní fáze: chloroform:methanol:konc.

vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05) byla reakce ukončena. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla tato směs za stálého míchání vlita do vody (25 ml) a vzniklá suspenze extrahována 3 x 25 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku na RVO. Surový produkt byl čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (30 g) nejprve s mobilní fází: chloroform:methanol:konc. vodný roztok hydroxidu amonného – 4:1:0,05. Frakce s produktem byly slity do baňky a odpařeny na vakuové odparce. Čistý produkt byl zvážen a převeden do vialky.



**Výtěžek:** 15 %

**Sumární vzorec:** C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O (487,64)

**Elementární analýza:** Vypočteno: C, 68,96; H, 7,65; N, 20,11

**HPLC-MS (ESI+):** 489,06; **HPLC-UV:** (82 %)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** 1,18-1,20 (m, 2H); 1,31-1,41 (m, 2H); 1,54-1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,64-1,74 (m, 4H); 1,92-1,94 (m, 4H); 1,97-2,01 (m, 2H); 2,95 (qui, *J*=6,5, 1H, CH); 3,93 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ; 4,69 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 5,22 (s(br), 1H, NH); 6,45 (d, *J*=8,5, 1H, CH), 6,90-7,11 (m, 4H, ArH); 7,21 (s, 1H, CH); 7,31 (s, 1H, CH); 7,59 (s(br), 1H, NH).

## 6 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce byla příprava nových derivátů 3,5,7-trisubstituovaných-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinů jako potenciálních inhibitorů cyklin-dependentních a FLT3 kináz. Nejprve byla provedena optimalizace dvou vybraných prekurzorů aminu **27** a **32**, následně bylo 9-ti stupňovou syntetickou cestou získáno 8 nových cílových inhibitorů pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **53-60**, se substitucí v pozici C3 (cyklopentylem), v pozici C5 (4-aminocyklohexylamino, 4-aminobutylamino a (*R*)-(1-ethyl-2-hydroxyethyl)amino skupinou) a v pozici C7 (vybranými amino-deriváty). Práce byla navržena na základě úspěšných výsledků biologického testování nedávno připravené série 2,6,9-trisubstituovaných purinových látek, které vykazují nejen významnou antiproliferační, ale i inhibiční a cytotoxickou aktivitu, a to především u výše zmíněných cyklin-dependentních a FLT3 kináz. Nejvýznamnějším purinovým derivátem z této řady byla látka s označením **BPA302**, jejíž příprava byla řešena během mé bakalářské práce. Tato látka se momentálně nachází v klinických studiích a představuje možný cíl pro budoucí léčbu neurodegenerativních či jiných nádorových onemocnění. Co se týká předběžně získaných dat z biologických studií tří nově substituovaných purinových bioizosterů pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu **54**, **58** a **59**, neprokázaly tak dobré výsledky, jako molekula **BPA302**. Naměřené hodnoty inhibiční schopnosti FLT3-WT a CDK2 u substancí **54** a **59** zaznamenali o 1-2 řády nižší aktivitu než **BPA302**. Nejlepší výsledky z těchto tří derivátů projevila látka s označením **PP9-3-3 (54)**, naopak nejslabší aktivitu vykazovala molekula **PP201 (58)**, jejíž hodnoty IC<sub>50</sub> i cytotoxicity se pohybovaly ~ okolo 1-5 μM.

I přes to, že byly očekávány pozitivnější výsledky biologických testů u sloučenin **54**, **58** a **59**, se od vývoje nových inhibitorů odvozených o purinového jádra neupouští. Stále jsou navrhovány nové přístupy k těmto zajímavým derivátům v naději směřující k objevu nových léčivých preparátů na širokou škálu nejen nádorových onemocnění.

## 7 Seznam použitých zkratek

ABL	fúzní protoonkogen
AKT	proteinkináza B
AL	aktivační smyčka
AML	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosin trifosfát
BCR/ABL	fúzní gen- molekulární marker pro chronickou myeloidní leukémii
CAK	cyklin-dependentní aktivační kináza
CBL	protein kódovaný savčím genem Cbl
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKs	cyklin-dependentní kinázy
CDKi	inhibitory cyklin-dependentních kináz
CEPBA	CCAAT/enhancer binding protein alpha
CHK1	checkpoint kináza 1
c-KIT	receptor faktoru kmenových buněk
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
CNS	cévní nervová soustava
CR	kompletní remise
CSF-1R	receptor faktoru 1 stimulující kolonie
cyc	cyklin
DFG – in/out	konzervativní prvek Asp-Phe-Gly – aktivní/neaktivní
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
ECD	extracelulární doména
EFS	přežití pacientů bez příhod
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FAK	focal adhesion kinase
FL	FLT3 ligand
FLT3	FMS - like tyrosine kinase 3



FLT3i	inhibitory FLT3 kináz
FLT3-ITD	mutace FLT3 způsobující interní tandemové duplikace
FLT3-TKD	mutace v aktivační smyčce intracelulární kinázové domény FLT3
FLT3-WT	wild type FLT3, fyziologická alela
FMS	receptor faktoru stimulujícího kolonie makrofágů
GAB2	GRB2 associated binding protein 2
E2R	transkripční faktor rodiny E2R regulující transkripci genů potřebných pro syntézu DNA
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	extracellular signal–regulated kinase
GI <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici růstu nádorových buněk
GIST	gastrointestinální stromální tumory
GTPasa	guanosintrifosfatáza
HER2	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2
HSP90	heat shock protein 90
IC <sub>50</sub>	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
Ig	imunoglobulin
JAK	Janus kináza
JM	juxtamembránová doména
JNK1	c-Jun N-terminální protein kináza 1
KI	interkinázová doména
MAPK	mitogen-aktivující protein kináza
MAT1	protein kódovaný genem MNAT1, slouží k aktivaci CDK
MDS	myelodysplastický syndrom
MEK	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
NC	normální karyotyp
NMP1	protein nukleofosmin 1
OS	celkové přežití
p53	nádorový supresor
PDGFR	receptor růstového faktoru odvozeného od krevních destiček
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza

PKC	protein-kináza C
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	protoonkoproteiny kódované genem c-ras
RET	glial cell – line derived neurotrophic factor receptor
RFS	doba přežití bez relapsu
Rho	terminační faktor transkripce
RTK	receptorová tyrosin kináza
RUNX1	runt-related transcription factor 1
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	Vztah mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou (Structure-activity relationship)
SHC	signální adaptorový protein
SHIP	inositol fosfatáza obsahující SH2 proteinovou doménu
Src	člen non-receptorového proteinu tyrosin-kinázové rodiny (SFK)
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce
TK	tyrosin-kinázová doména
TKI	tyrosin-kinázové inhibitory
TM	transmembránová doména
Trk A	tropomyosinová receptorová kináza A
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

## 8 Použitá literatura

- [1] Irons R. D., Stillman W.S. (1996): The proces sof leukemogenesis. *Enviromental Health Perspective*, **107**, 1239-1246.
- [2] Rahman N. (2014): Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature*, **505**, 302-308.
- [3] Motyckova G., Stone R. M. (2010): The role of molecular tests in acute myelogenous leukemia treatment decisions. *Current Hematologic Malignancy Report*, **5**, 109-117.
- [4] Gucký T., Řezníčková E., Radošová Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V., Kryštof V. (2018): Discovery of N2-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for Acute Myeloid Leukemia with FLT3Mutations. *Journal of Medicinal Chemistry*, <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.7b01529>
- [5] Nakao M., Yokota S., Iwai T., Kaneko H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., Misawa S. (1996): Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **10**, 1911-1918.
- [6] Stirewalt D. L., Kopecky K. J., Meshinchi S., Engel J. H., Pogosova-Agadjanyan E. L., Linsley J., Slovak M. L., Willman C. L., Radich J. P. (2006): Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **107**, 3724-3726.
- [7] Pemmaraju N., Kantarjian H., Ravandi F., Cortes J. (2011): FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era? *Cancer*, **117**, 3293-3304.
- [8] Wander S. A., Levis M. J., Fathi A. T. (2014): The evolving role of FLT inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Therapeutic Advances in Hematology*, **5**, 65-77.
- [9] Pemmaraju N., Kantarjian H., Andreeff M., Cortes J., Ravandi F. (2014): Investigational FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **23**, 943-954.
- [10] Zimmerman E. I., Turner D. C., Buaboonnam, J., Hu S., Orwick S., Roberts M. S.,

- Janke L. J., Ramachandran A., Stewart C. F., Inaba H., Baker S. D. (2013) Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood*, **122**, 3607-3615.
- [11] Lee L.Y., Hernandez D., Rajkhowa T., Smith S.C., Raman J. R., Nguyen B., Small D., Levis M. (2017): Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*, **129**, 257-260.
- [12] Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti, S. (2012): An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology Reviews*, **6**, 64-74.
- [13] Rosnet O., Mattei M.G., Marchetto S., Birnbaum D. (1991): Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, **9**, 380-385.
- [14] Carow C.E., Kim E., Hawkins A.L., Webb H. D., Griffin C. A., Jabs E. W., Civin C. I., Small D. (1995): Localization of the human stem cell tyrosine kinase –1 gene (FLT3) to 13q12 - >q13. *Cytogenetic and Genome Research*, **70**, 255-257.
- [15] Rosnet O. (1999): FLT3 (Fms-like tyrosine kinase3). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, **3**, 73-74.
- [16] Agnès F., Shamoon B., Dina C., Rosnet O., Birnbaum D., Galibert F. (1994): Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among gene encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, **145**, 283-288.
- [17] Abu-Duhier F. M., Goodeve A.C., Wilson G.A., Care R.S., Peake I.R., Reilly J. T. (2001): Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis. *British journal of haematology*, **113**, 1076-1077.
- [18] Rosnet O., Schiff C., Pébusque M.J., Marchetto S., Tonnelle C., Toiron Y, Birg F., Birnbaum D. (1993): Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, **82**,1110-1119.
- [19] Griffith J., Black J., Faerman C., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J., Saxena K.

- (2004): The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell*, **13**, 169-178.
- [20] Lyman S.D., Jacobsen S.E. (1998): c-kit ligand and flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, **91**, 1101-1134.
- [21] Markovic A., Mackenzie K.L., Lock R.B. (2005): FLT3: a new focus in the understanding of acute leukemia. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **37**, 1168-1172.
- [22] Rosnet O., Buhring H.J., Marchetto S., Rappold I., Layagna C., Sainty D., Arnoulet C., Chabannon C., Kanz L., Hannum C., Birnbaum D. (1996): Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignantheatopoietic cells. *Leukemia*, **10**, 238-248.
- [23] Meshinchi S., Appelbaum F.R. (2009): Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical cancer research*, **15**, 4263-4269.
- [24] Ray R.J., Paige Ch.J., Furlonger C., Lyman S. D., Rottapel R. (1996): Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *European Journal of Immunology*, **26**, 1504-1510.
- [25] Rusten L.S., Lyman S.D., Veiby O.P., Jacobsen S.E. (1996): The FLT3 ligand is a direkt and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow cells in vitro. *Blood*, **87**, 3563-3570.
- [26] Jacobs A. (1997): Leukaemia Research Fund annual guest lecture 1990. Genetics lesions in preleukaemia. *Leukemia*, **5**, 277-282.
- [27] Ley T. J., Mardis E. R., Ding L., Fulton B., McLellan M. D., Chen K., Dooling D., Dunford-Shore B. H., McGrath S., Hickenbotham M., Cook L., Abbott R., Larson D.E., Koboldt D.C., et al. (2008): DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, **456**, 66-72.
- [28] Grove C. S., Vassiliou G. S. (2014): Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Disease models & mechanisms*, **7**, 941-951.
- [29] Levis M., Small D. (2003): FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*, **17**, 1738-

1752.

- [30] Gazdová J., Dvořáková D., Ježíšková I., Rázga F., Jurček T., Mayer J. (2009): Úloha FLT3 mutací v patogenezi akutní myeloidní leukémie. *Transfuze a Hematologie Dnes*, **15**, 229-236.
- [31] Chen Y., Pan Y., Guo Y., Zhao W., Ho W. T., Wang J., Xu M., Yang F. C., Zhao Z. J. (2017): Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investigation*, 4:48.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460107/>
- [32] Schnittger S., Schoch .C, Dugas M., Kern W., Wuchter C., Löffler H., Sauerland C. M., Serve H., Büchner T., Haferlach T., Hiddemann W. (2002): Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, **100**, 59-66.
- [33] Burčková K. (2009): *Akutní myeloidní leukémie a prognostický dopad interních tandemových duplikací genu FLT3*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.
- [34] Schwarz J., Marková J., Fuchs O., Polák J., Haškovec C., Cetkovský P. (2008): Význam mutací genu FLT3 a dalších molekulárních markerů pro prognózu a léčebný přístup u akutní myeloidní leukémie. *Transfuze a Hematologie Dnes*, **14**, 116-122.
- [35] Renneville A., Roumier C., Biggio V., Nibourel O., Boissel N., Fenaux P., Preudhomme C. (2008): Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, **22**, 915-931.
- [36] Marková J. (2015): *Molekulárně genetické změny v akutní myeloidní leukémii*. *Dizertační práce*, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.
- [37] Gale R. E., Green C., Allen C., Mead A. J., Burnett A. K., Hills R. K., Linch D. C. (2008): The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute

- myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 2776-2784.
- [38] Meshinchi S., Stirewalt D. L., Alonzo T. A., Boggon T. J., Gerbing R. B., Rocnik J. L., Lange B. J., Gilliland D. G., Radich J. P. (2008): Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*, **111**, 4930-4933.
- [39] Kusec R., Jaksic O., Ostojic S., Kardum-Skelin I., Vrhovac R., Jaksic B. (2006): More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, **108**, 405-406.
- [40] Koszarska M., Meggyesi N., Bors A., Batai A., Csacsovszki O., Lehoczky E., Adam E., Kozma A., Lovas N., Sipos A., Krahling T., Dolgos J., Remenyi P., Fekete S., Masszi T., Tordai A., Andrikovics H. (2013): Medium-sized FLT3 internal tandem duplications confer worse prognosis than short and long duplications in a nonelderly acute myeloid leukemia cohort. *Leukemia & Lymphoma*, **55**, 1510-1517.
- [41] Kottaridis P. D., Gale R. E., Frew M. E., Harrison G., Langabeer S. E., Belton A. A., Walker H., Wheatley K., Bowen D. T., Burnett A. K., Goldstone A. H., Linch D. C. (2001): The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, **98**, 1752-1759.
- [42] Kiyoi H., Towatari M., Yokota S., Hamaguchi M., Ohno R., Saito H., Naoe T. (1998): Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which cause constitutive activation of the product. *Leukemia*, **12**, 1333-1337.
- [43] Molekulární onkologie – inovace výuky onkologie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Plzni – 7. Akutní myeloidní leukemie,  
<http://www.molekularnionkologie.cz/studenti.html>
- [44] Bacher U., Haferlach T., Kern W., Haferlach C., Schnittger S. (2007): A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **92**, 744-752.

- [45] Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R., Naoe T. (2001): Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, **97**, 2434-2439.
- [46] Abu-Duhier F. M., Goodeve A. C., Wilson G. A., Care R. S., Peake I. R., Reilly J. T. (2001): Identification of novel FLT3 Asp 835 mutations in adult acute myeloid leukemia. *British journal of hematology*, **113**, 983-988.
- [47] Whitman S. P., Ruppert A. S., Radmacher M. D., Mrozek K., Paschka P., Langer C., Baldus C. D., Wen J., Rucke F., Powell B. L., Kolitz J. E., Larson R. A., Caligiuri M. A., Marcucci G., Bloomfield C. D. (2008): FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*, **111**, 1552-1559.
- [48] Moreno I., Martin G., Bolufer P., Barragan E., Rueda E., Román J., Fernandez P., Leon P., Mena A., Cervera J., Torres A., Sanz M. A. (2003): Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **88**, 19-24.
- [49] Mead A. J., Linch D. C., Hills R. K., Wheatley K., Burnett A. K., Gale R. E. (2007): FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **110**, 1262-1270.
- [50] Sheikhha M. H., Awan A., Tobal K., Liu Yin J. A. (2003): Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. *The Hematology journal*, **4**, 41-46.
- [51] Zhao M., Kiyoi H., Yamamoto Y., Ito M., Towatari M., Omura S., Kitamura T., Ueda R., Saito H., Naoe T. (2000): *In vitro* treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*, **14**, 374-378.



- [52] Knapper S., Burnett A. K., Littlewood T., et al. (2004): A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **103**, 3669-3676.
- [53] Stone R. M., DeAngelao D. J., Klimek V., Galinsky I., Estey E., Nimer S. D., Grandin W., Lebowitz D., Wang Y., Cohen P., Fox E. A., Neuberg D., Clark J., Gilliland D. G., Griffin J. D. (2005): Patients with acute myeloid leukemia and activating mutation in FLT3 respond to small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*, **105**, 54-60.
- [54] O'Farrell A. M., Foran J. M., Fiedler W., Serve H., Paquette R. L., Cooper M. A., Yuen H. A., Louie S. G., Kim H., Nicholas S., Heinrich M. C., Berdel W. E., et al. (2003): An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clinical Cancer Research*, **9**, 5465-5476.
- [55] Fiedler W., Serve H., Dohner H., Schwittay M., Ottmann O. G., O'Farrell A. M., Bello C. L., Allred R., Manning W. C., Cherrington J. M., Louie S. G., Hong W., Brega N. M., Massimini G., Scigalla P., et al. (2005): A phase I study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for disease. *Blood*, **105**, 986-993.
- [56] DeAngelo D. J., Stone R. M., Heaney M. L., Nimer S. D., Paquette R. L., Klisovic R. B., Caligiuri M. A., Cooper M. R., Lecerf J.-M., Karol M. D., et al. (2006): Phase I clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*, **108**, 3674-3681.
- [57] Bailey E., Li L., Duffield A. S., Ma H. S., Huso D. L., Small D. (2013): FLT3/D835Y mutation knock-in mice display less aggressive disease compared with FLT3/internal tandem duplication (ITD) mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **110**, 21113-21118.
- [58] Zhang J., Yang P. L., Gray N. S. (2009): Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 28-39.

- [59] Levis M. S., Smith D. B., Beran M., Baer M. R., Erba H. P., Cripe L., Coutre S., Advani A., Perl A., Devetten M., Stuart R., et al. (2005): A randomized, open-label study of lestaurnitib (CEP-701), an oral FLT3 inhibitor, administered in sequence with chemotherapy in patients with relapsed AML harboring FLT3 activating mutations: clinical response correlates with successful FLT inhibition. *Blood*, 106:403.  
<http://www.bloodjournal.org/content/106/11/403?sso-checked=true>
- [60] Stone R. M., Fischer T., Paquette R., Schiller G., Schiffer A., Ehninger G., Cortes J., Kantarjian H., DeAngelo D. A., Massimini G., Li X., Phillips P., Giles F. (2006): Phase IB study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine consolidation in newly diagnose adult patients (pts) with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 108:157.  
<http://www.bloodjournal.org/content/108/11/157?sso-checked=true>
- [61] Ke Y. Y., Singh V. K., Coumar M. S., Hsu Y. C., Wang W. C., Song J. S., et al. (2015): Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification. *Scientific Reports*, 5:11702.  
<https://www.nature.com/articles/srep11702>
- [62] Smith C. C., Lin K., Stecula A., Sali A., Shah N. P. (2015): FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors. *Leukemia*, **29**, 2390–2392.
- [63] Smith C. C., Wang Q., Chin C. S., Salerno S., Damon L. E., Levis M. J., Perl A. E., Travers K. J., Wang S., Hunt J. P., Zarrinkar P. P., Schadt E. E., Kasarskis A., Kurivan J., Shan N. P. (2012): Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*, **485**, 260–263.
- [64] Larrosa-Garcia M., Baer M. R. (2017): FLT3 inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Molecular Cancer therapeutics*, **16**, 991-1001.
- [65] Novartis home page: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-drug-rydaptr-midostaurin-receives-eu-approval-newly-diagnosed-flt3> (4.5.2018)
- [66] Weisberg E., Boulton C., Kelly L. M., Manley P., Fabbro D., Meyer T., Gilliland D. G., Griffin J. D. (2002): Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small

- molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell*, **1**, 433–443.
- [67] Stone R. M., Fisher T., Paquette R., Shiller G., Schiffer Ch. A., Ehninger G., Cortes J., Kantarjian H., DeAngelo D. A., Yu R., Zhang L., Cohen P. S., Wang Y., Phillips P., Giles F. (2005): Phase 1B study of PKC412, an oral FLT3 kinase inhibitor, in sequential and simultaneous combinations with daunorubicin and cytarabine (DA) induction and high-dose cytarabine consolidation in newly diagnosed patients with AML. *Blood*, 106:404. <http://www.bloodjournal.org/content/106/11/404?sso-checked=true>
- [68] Stone R. M., De Angelo J., Galinsky I., Estey E., Klimek V., Grandin W., Lebwohl D., Yap A., Cohen P., Fox E., Neuberg D., Clark J., Gilliland D. G., Griffin J. D. (2004): PKC412 FLT3 inhibitor therapy in AML: results of a phase II trial. *Ann Hematol*, **83**, 89–90.
- [69] Weisberg E., Barrett R., Liu Q., Stone R., Gray N., Griffin J. D. (2009): FLT3 Inhibition and mechanism of Drug Resistance in mutant FLT3 – Positive AML. *Drug Resistance Updates*, **12**, 81-89.
- [70] Stone R. M., Mandrekar S., Sanford B. L., Geyer S., Bloomfield C. D., Dohner K., et al. (2015): The Multi- Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High - Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood*, 126. <https://ash.confex.com/ash/2015/webprogramscheduler/Paper80269.html>
- [71] Kelly L. M., Yu J. C., Boulton C. L., Apatira M., Li J., Sullivan C. M., Williams I., Amaral S. M., Curley D. P., Dulons N., Neuberg D., Scarborough R. M., Pandey A., Hollenbach S., Abe K., Lokker N. A., Gilliland D. G., Giese N. A. (2002): CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell*, **1**, 421–432.

- [72] Cheng Y., Paz K. (2008): Tandutinib, an oral, small-molecule inhibitor of FLT3 for the treatment of AML and other cancer indications. *IDrugs*, **11**, 46–56.
- [73] Levis M., Allebach J., Tse K. F., Zheng R., Baldwin B. R., Smith B. D., Jones-Bolin S., Ruggeri B., Dionne C., Small D. (2002): A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, **99**, 3885–3891.
- [74] Smith B. D., Levis M., Beran M., Giles P., Russell B. L., Hellriegel E., Dausen T., Allebach J., Small D. (2003): Single agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows initial response in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, **22**:779.
- [75] Smith B. D., Levis M., Beran M., Giles F., Kantarjian H., Berg K., Murphy K. M., Dausen T., Allebach J., Small D. (2004): Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, **103**, 3669–3676.
- [76] Knapper S., Mills K. I., Gilkes A. F., Austin S.J., Walsh V., Burnett A. K. (2006): The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3-mutated and wild-type cases. *Blood*, **108**, 3494–3503.
- [77] Kancha R. K., Grundler R., Peschel C., Duyster J. (2007): Sensitivity toward sorafenib and sunitinib varies between different activating and drug-resistant FLT3-ITD mutations. *Experimental Hematology*, **35**, 1522–1526.
- [78] Abrams T. J., Lee L. B., Murray L. J., Pryer N. K., Cherrington J. M. (2003): SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2**, 471–478.
- [79] O'Farrell A. M., Abrams T. J., Yuen H. A., Ngai T. J., Louie S. G., Yee K. W., Wong I. M., Hong W., Lee L. B., Town A., Smolich B. D., Manning W. C., Murray L. J., Heinrich M. C., Cherrington J. M. (2003): SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, **101**, 3597–3605.
- [80] Petruželka L. (2007): Sunitinib v léčbě karcinomu ledviny. *Remedia*, **17**, 211–215.

- [81] Fiedler W., Serve H., Dohner H., Schwittay M., Ottmann O. G., O'Farrell A. M., Bello C. L., Allred R., Manning W. C., Cherrington J. M., Louie S. G., et al. (2005): A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*, **105**, 986-993.
- [82] Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, et al. Sunitinib and intensive chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia and activating FLT3 mutations: results of the AMLSG 10-07 study (ClinicalTrials.gov no. NCT00783653). *Blood*, 120.  
<https://aspergillus.org.uk/content/sunitinib-and-intensive-chemotherapy-patients-acute-myeloid-leukemia-and-activating-flt3>
- [83] Demetri G. D., van Oosterom A. T., Garrett C. R., Blackstein M. E., Shan M. H., Verweij J., McArthur G., Judson I. R., Heinrich M. C., Morgan J. A., Desai J., Fletcher C. D., et al. (2006): Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet*, **368**, 1329-1338.
- [84] Zhang W., Konopleva M., Shi Y. X., McQueen T., Harris D., Ling X., Estrov Z., Quintas-Cardama A., Small D., Cortes J., Andreeff M. (2008): Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, **100**, 184–198.
- [85] Lierman E., Lahortiga I., Van Mieghroet H., Mentens N., Marynen P., Cools J. (2007): The ability of sorafenib to inhibit oncogenic PDGFRbeta and FLT3 mutants and overcome resistance to other small molecule inhibitors. *Haematologica*, **92**, 27–34.
- [86] Auclair D., Miller D., Yatsula V., Pickett W., Carter C., Chang Y., Zhang X., Wilkie D., Burd A., et al. (2007): Antitumor activity of sorafenib in FLT3-driven leukemic cells. *Leukemia*, **21**, 439-445.
- [87] Lee L. Y., Hernandez D., Rajkhowa T., Smith S. C., Raman J. R., Nguyen B., Small D., Levis M. (2017): Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*, **129**, 257-260.

- [88] Ueno Y., Kaneko N., Saito R., Kondoh Y., Shimada I., Mori M., Kuromitsu S. (2014): ASP2215, a novel FLT3/AXL inhibitor: Preclinical evaluation in combination with cytarabine and anthracycline in acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Clinical Oncology*, 32:15.  
[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.7071](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.7071)
- [89] Smith C. C., Levis M. J., Litzow M. R., Perl A., Altman J. K., Gill S. C., Kadokura T., Yuen G. J., Fisman O., Liu Ch., Nasage I., Sargent B., Welter N., Bahceci E. (2015): Pharmacokinetic Profile and Pharmacodynamic Effects of ASP2215, a Selective, Potent Inhibitor of FLT3/AXL, in Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia: Results from a First-in-Human Phase 1/2 Study. *Blood*, 126:4836.  
<http://www.bloodjournal.org/content/126/23/4836?sso-checked=true>
- [90] Altman J. K., Perl A. E., Cortes J. E., Levis M. J., Smith C. C., Litzow R., Baer M., Claxton D. F., Erba H. P. et al. (2015): Antileukemic Activity and Tolerability of ASP2215 80mg and Greater in FLT3 Mutation-Positive Subjects with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia: Results from a Phase 1/2, Open-Label, Dose-Escalation/Dose-Response Study. *Blood*, 126:321.  
<http://www.bloodjournal.org/content/126/23/321?sso-checked=true>
- [91] Perl A. E., Cortes J. E., Strickland S. A., Ritchie E. K., Neubauer A., Martinelli G., Naoe T., Pigneux A., Rousselot P. H., et al. (2016): A phase 3, open-label, randomized study of the FLT3 inhibitor gilteritinib versus salvage chemotherapy in adults with first relapse or primary refractory FLT3 mutation-positive acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 34:15.  
[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.TPS7072](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.TPS7072)
- [92] Zarrinkar P. P., Gunawardane R. N., Cramer M. D., Gardner M. F., Brigham D., Karaman M. W., Pratz K. W., et al. (2009): AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, **114**, 2984-2992.
- [93] Cortes J. E., Kantarjian H., Foran J. M., Ghirdaladze D., Zodelava M., Borthakur G.,

- Gammon G., Trone D., Armstrong R. C., James R. C., Levis M. (2013): Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 3681-3687.
- [94] Grunwald M. R., Levis M. J. (2013): FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *International Journal of Hematology*, **97**, 683-94.
- [95] Erba H. P., Sekeres M. K., Dombret H., Amadori S., Zernovak O., Mires D. E., Ge N., Hanyok J. (2016): Phase 3 (P3) study of quizartinib (Q) or placebo (P) with induction (IND) and consolidation chemotherapy (CON) and as maintenance (MN) in patients (pts) with newly diagnosed (NDx) FLT3-ITD–positive acute myeloid leukemia (AML): the QuANTUM-First study. *Journal of Clinical Oncology*, 34:15.  
[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.TPS7073](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.TPS7073)
- [96] Levis M. J., Martinelli G., Perl A. E., Dombret H., Steffen B., Rousselot P. H., Estey E., Shah N. P., Gammon G., Trone D., Cortes J. E. (2014): The benefit of treatment with quizartinib and subsequent bridging to HSCT for FLT3-ITD(+) patients with AML. *Journal of Clinical Oncology*, 32:15.  
[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.7093](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.7093)
- [97] Randhawa J. K., Kantarjian H. M., Borthakur G., Thompson P. A., Konopleva M., Daver N., Pemmaraju N., Jabbour E., Kadia T. M. et al. (2014): Results of a phase II study of crenolanib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia patients (pts) with activating FLT3 mutations. *Blood*, 124:389.  
<http://www.bloodjournal.org/content/124/21/389?sso-checked=true>
- [98] Hassanein M., Almahayni M. H., Ahmed S. O., Gaballa S., El Fakih R. (2016): FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, **16**, 543-549.
- [99] Gozgit J. M., Wong M. J., Wardwell S., Tyner J. W., Loriaux M. M., Mohemmad Q. K.,

- Narasimhan N. I., Shakespeare W. C., Wang F., Druker B. J., Clackson T., Rivera V. M. (2011): Potent activity of ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Molecular Cancer Therapeutics*, **10**, 1028–1035.
- [100] Shiotsu Y., Kiyoi H., Ishikawa Y., Tanizaki R., Shimizu M., Umehara H., Ishii K., Mori Y., Ozeki K., et al. (2009): KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T3151-mutated BCR-ABL translocation. *Blood*, **114**, 1607-1617.
- [101] Cortes J., Roboz G. J., Kantarjian H. M., Feldman E. J., Karp J. E., Pratz K. W., Rao N. S., Akinaga S., Levis M. J. (2008): A phase I dose escalation study of KW-2449, an oral multi-kinase inhibitor against FLT3, Abl, FGFR1 and Aurora in patients with relapsed/refractory AML, ALL and MDS or resistant/intolerant CML. *Blood*, 112:2967. <http://www.bloodjournal.org/content/112/11/2967?sso-checked=true>
- [102] Pratz K. W., Cortes J., Roboz G. J., Rao N., Arowojolu O., Stine A., Shiotsu Y., Shudo A., Akinaga S., Small D., Karp J. E., Levis M. (2008): A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood*, **113**, 3938-3946.
- [103] Schenone S., Brullo C., Botta M. (2008): Small molecules ATP-competitive inhibitors of FLT3: a chemical overview. *Current Medicinal Chemistry*, **15**, 3113–3132.
- [104] Clark J. J., Cools J., Curley D. P., Yu J. C., Lokker N. A., Giese N. A., Gilliland D. G. (2004): Variable sensitivity of FLT3 activation loop mutations to the small molecule tyrosine kinase inhibitor MLN518. *Blood*, **104**, 2867-2872.
- [105] Nguyen B., Williams A. B., Young D. J., Ma H., Li L., Levis M., Brown P., Small D. (2017): FLT3 activating mutations display differential sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget*, **8**, 10931-10944.
- [106] Dalinger I. L., Vatsadse I. A., Shevelev S. A., Ivachtchenko A. V. (2005): Liquid – Phase Synthesis of Combinatorial Libraries Based on 7-Trifluoromethyl-Substituted Pyrazolo[1,5-*a*]Pyrimidine Scaffold. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **7**, 236-245.



- [107] Stepaniuk O. O., Matvienko V. O., Kondratov I. L., Vitruk I. V., Tolmachev A. O. (2013): Synthesis of new pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines by reaction of  $\beta,\gamma$ -unsaturated  $\gamma$ -alkoxy- $\alpha$ -ketoester with *N*-unsaturated 5-aminopyrazoles. *Synthesis*, **45**, 925-930.
- [108] Almansa C., de Arriba A. F., Cavalcanti F. L., Gómez L. A., Miralles A., Merlos M., Garcia-Rafanell J., Forn J. (2001): Synthesis and SAR of a new series of COX-2-selective inhibitors: pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines. *Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 350-360.
- [109] Ajani O. O., Isaac J. T., Owwoye T. F., Akinsiku A. A. (2015): Exploration of the Chemistry and Biological Properties of Pyrimidine as a Privilege Pharmacophore in Therapeutics. *International Journal of Biological Chemistry*, **9**, 148-177.
- [110] Hassan A. S., Hafez T. S., Osman S. A. M., Ali M. M. (2015): Synthesis and *in vitro* cytotoxic activity of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines and related Schiff bases. *Turkish Journal of Chemistry*, **39**, 1102-1113.
- [111] Kamal A., Tamboli J. R., Nayak V. L., Adil S. F., Vishnuvardhan M. V. P. S., Ramakrishna S. (2013): Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine linked aminobenzothiazole conjugates as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**, 3268-3215.
- [112] Al-Matar H. M., Khalil K. D., Adam A. Y., Elnagdi M. H. (2010): Green one pot solvent – free synthesis of pyrano[2,3-*c*]pyrazoles and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines. *Molecules*, **15**, 6619-6629.
- [113] Hassan A. S., Hafez T. S., Osman S. A. (2015): Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of Some New 5-aminopyrazole and Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine Derivatives. *Scientia Pharmaceutica*, **83**, 27-39.
- [114] Mukaiyama H., Nishimura T., Shiohara H., Kobayashi S., Komatsu Y., Kikuchi S., Tsuji E., Kamada N., Ohnota H., Kusama H. (2007): Discovery of novel 2-Anilinopyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives as c-Src kinase inhibitors for the treatment of acute ischemic stroke, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 881-889.

- [115] Ismail N., Ali G., Ibrahim D., Elmetwali A. (2016): Medicinal attributes of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine based scaffold derivatives targeting kinases as anticancer agents. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**, 60-70.
- [116] Yeatman T. J. (2004): A renaissance for SRC. *Natural Reviews. Cancer*, **4**, 470-480.
- [117] Nam H.-J., Im S.-A., Oh D.-Y., Elvin P., Kim H.-P., Yoon Y.-K., Min A., Song S.-H., Han S.-W., Kim T.-Y., Bang Y.-J. (2013): Antitumor activity of saracatinib (AZD0530), a c-Src/Abl kinase inhibitor, alone or in combination with chemotherapeutic agents in gastric cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **12**, 16-26.
- [118] Finn R. S. (2008): Targeting Src in breast cancer. *Annals of Oncology*, **19**, 1379-1386.
- [119] Ishizawa R., Parsons S. J. (2004): c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, **6**, 209-214.
- [120] Okamoto W., Okamoto I., Yoshida T., Okamoto K., Takezawa K., Hatashita E., et al. (2010): Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics*, **9**, 1188-1197.
- [121] Humar B., Fukuzawa R., Blair V., Dunbier A., More H., Charlton A., et al. (2007): Destabilized adhesion in the gastric proliferative zone and c-Src kinase activation mark the development of early diffuse gastric cancer. *Cancer Research*, **67**, 2480-2489.
- [122] Shor A. C., Keschman E. A., Lee F. Y., Muro-Cacho C., Letson G. D., Trent J. C., et al. (2007): Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Research*, **67**, 2800-2808.
- [123] Huvneers S., Danen E. H. (2009): Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, **122**, 1059-1069.
- [124] Parsons J. T., Martin K. H., Slack J. K., Taylor J. M., Weed S. A. (2000): Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, **19**, 5606-5613.
- [125] Schepke L., Aguilar E., Gariano R. F., Jacobson R., Hood J., Doukas J., Cao J.,

- Noronha G., Yee S., Weis S., Martin M. B., Soll R., Cheres D. A., Friedlander M. (2008): Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR 2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**, 2337-2346.
- [126] Mukaiyama H., Nishimura T., Kobayashi S., Ozawa T., Kamada N., Komatsu Y., Kikuchi S., Oonota H., Kusama H., (2007): Synthesis and c-Src inhibitory activity of imidazo[1,5-a]pyrazine derivatives as an agent for treatment of acute ischemic stroke. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 868-885.
- [127] Foloppe N., Fisher L. M., Howes R., Potter A., Robertson A. G. S., Surgenor A. E. (2006): Identification of chemically diverse Chk1 inhibitors by receptor-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 4792-4802.
- [128] Yu H. (2007): Chk1: a double agent in cell cycle checkpoints. *Developmental Cell*, **12**, 1-2.
- [129] Xiao Z., Chen Z., Gunasekera A. H., Sowin T. J., Rosenberg S. H., Fesik S., Zhang H. (2003): Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**, 21767-21773.
- [130] Madoz-Gurpide J., Cañamero M., Sanchez L., Solano J., Alfonso P., Casal J. I. (2007): A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, **6**, 2150-2164.
- [131] Speers C., Tsimelzon A., Sexton K., Herrick A. M., Gutierrez C., Culhane A., Quackenbush J., Hilsenbeck S., Cheng J., Brown P. (2009): Identification of novel kinase targets for the treatment of estrogen receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **15**, 6327-6340.
- [132] L. Verlinden, Vanden Bempt I., Eelen G., Drijkongen M., Verlinden I., Marchal K., De Wolf-Peeters C., Christiaens M. R., et al. (2007): The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor/progesterone receptor/HER-2 breast carcinomas. *Cancer Research*, **67**, 6574-6581.
- [133] Eastman A. (2004): Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic

- strategies. *Journal of Cellular Biochemistry*, **91**, 223-231.
- [134] Labroli M., Paruch K., Dwyer M. P., Alvarez C., Keertikar K., Poker C., Rossman R., Duca J. S., Fischmann T. O., Madison V., Parry D., Davis N., Seghezzi W., Wiswell D., Guzi T. J. (2011): Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinebase CHK1 inhibitors: a template-based approach part 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 471-474.
- [135] Dwyer M. P., Paruch K., Labroli M. A., Alvarez C., Keertikar K., Poker C., Rossman R., Fischmann T. O., Duca J. A., Madison V., Parry D., Davis N., Seghezzi W., Wiswell D., Guzi T. (2011): Discovery of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-based CHK1 inhibitors: a template-based approach--part 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 467-470.
- [136] McCubrey J. A., Milella M., Tafuri A., Martelli A. M., Lunghi P., Bonati A., et al. (2008): Targeting the Raf/MEK/ERK pathway with small-molecule inhibitors. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **9**, 614-630.
- [137] Yang H., Higgins B., Kolinsky K., Packman K., Bradley W. D., Lee R. J., Schostack K., Simcox M. E., Kopetz S., Heimbrosk D., Lestini B., Bollag G., Su F. (2012): Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Research*, **72**, 779-789.
- [138] McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., et al. (2007): Role of the Raf/Mek/Erk pathway in cell growth, malignit transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773**, 1263-1284.
- [139] Flaherty K. T., Puzanov I., Kim K. B., et al. (2010): Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **363**, 809-819.
- [140] Ribas A., Kim K., Schuchter L., et al. (2011): BRIM-2: an open-label, multicenter Phase II study of RG7204 (PLX4032) in previously treated patients with BRAF V600E mutation- positive metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*, 29:15.  
[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2011.29.15\\_suppl.8509](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.8509)

- [141] Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., et al. (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, **364**, 2507-2516.
- [142] Berger D. M., Torres N., Dutia M., Powell D., Ciszewski G., Gopalsamy A., Levin J. I., Kim K., Xu W., Wilhelm J., Hub Y., Collins K., Feldberg L., Kim S., Frommer E., Wojciechowski D., Mallon R., (2009): Non-hinge-binding pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as potent B-Raf kinase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**, 6519-6523.
- [143] Sánchez-Martínez C., Gelbert L. M., Lallena M. J., de Dios A. (2015): Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 3420-3435.
- [144] De Lartigue J. (2014): CDK Becomes Hot Target Again: Cell Cycle Inhibitors Compete for Success in Breast Cancer and CLL. *Oncology Live*, 1-3.  
[www.onclive.com/publications/oncology-live/2014/cdk-becomes-hot-target-again-cell-cycleinhibitors-compete-for-success-in-breast-cancer-and-ctl/1](http://www.onclive.com/publications/oncology-live/2014/cdk-becomes-hot-target-again-cell-cycleinhibitors-compete-for-success-in-breast-cancer-and-ctl/1).
- [145] Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**, 417-425.
- [146] Asghar U., Witkiewicz A.K., Turner N.C., Knudsen E.S. (2015): The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**,130-146.
- [147] Malumbres M., Barbacid M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews cancer*, **9**, 153-166.
- [148] Heathcote D. A., Patel H., Kroll S. H. B., Hazel P., Periyasamy M., Alikian M., Kanneganti S. K., Jogalekar A. S., Scheiper B., Barbazanges M., Blum A., Brackow J., Siwicka A., Pace R. D. M., Fuchter M. J., Snyder J. P., Liotta D. C., Freemont P. S., Aboagye E. O., Coombes R. C., Barrett A. G. M., Ali S. (2010): A novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein kinases 1, 2, and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration.

*Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 8508-8522.

- [149] Yu D. S., Zhao R. X., Hsu E. L., Cayer J., Ye F., Guo Y., Shyr Y., Cortez D. (2010): Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Reports*, **11**, 876-882.
- [150] Krystof V., Uldrijan S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets*, **11**, 291-302.
- [151] Blachly J. S., Byrd J. C. (2013): *Leukemia & Lymphoma*, **54**, 2133.
- [152] Hardcastle I.R., Golding B.T., Griffin R.J. (2002): Designing Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 325- 348.
- [153] Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N., Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R., Nomeir A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E. M. (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin – dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, **9**, 2344-2353.
- [154] Paruch K., Dwyer M.P., Alvarez C., Brown C., Chan T.-Y., Doll R.J., Keertikar K., Knutson C., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fishmann T., Hruza A., Madison V., Nomeir A.A., Wang Y. et al. (2010): Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **1**, 204-208.
- [155] Feldmann G., Mishra A., Bisht S., Karikari C., Garrido-Laguna I., Rasheed Z., Ottenhof N.A., Dadon T., Alvarez H., Fendrich V., Rajeshkumar N.V., Matsui W., Brossart P., et al. (2011): Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biology & Therapy* **12**, 598-609.
- [156] Mita<sup>a</sup> M.M., Joy A.A., Mita<sup>b</sup> A., Sankhala K., Jou Y.M., Zhang D., Statkevich P., Zhu Y., Yao S.L., Small K., Bannerji R., Shapiro C.L. (2014): Randomized phase II trial of the cyclin- dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in

- patients with advanced breast cancer. *Clinical Breast Cancer* **14**, 169-176.
- [157] Padrtová R. (2015): Studium syntézy a biologické aktivity vybraných derivátů 2-substituovaných-9-cyklopentyl-6-biarylamino-9H-purinu. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- [158] Phillipson L. J., Segal D. H., Nero T. L., Parker M. W., Wan S. S., de Silva M., Guthridge M. A., Wei A. H., Burns C. J. (2015): Discovery and SAR of novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as inhibitors of CDK9. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**, 6280-6296.
- [159] Lim S., Kaldís P. (2013): Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, **140**, 3079-3093.
- [160] Sharma S., Bhatia M. S. (1989): Synthesis and herbicidal activity of  $\alpha$ -cyanoalkylidenacetamides. *Journal of the Indian Chemical Society*, **66**, 116-117.
- [161] Park S. U., Chung S. K., Newcomb M. (1986): Acceptor, donor, and captodative stabilization in transitiv states of 5-hexen-1-yl radical cyclization. *Journal of the American Chemical Society*, **108**, 240-244.
- [162] WO 2015074135 A1: Laurent A., Rose Y. (28. May 2015): Protein kinase inhibitors.
- [163] WO 2004022560A1: Guzi T. J., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R. J., Giriavallabhan V. M., Dillard L. W., et al. Pyrazolopyrimidines as cyclin dependent kinase inhibitors.
- [164] CA 2497544 A1: Guzi T., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R. J., et al. (1 April 2004): Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines compounds as cyclin dependent kinase inhibitors.
- [165] Collins J. L., Shearer B. G., Oplinger J. A., Jeffrey A., Lee S., Garvey E. P., Salter M. D., et al. (1998): *N*-phenylamidines as selective inhibitor sof human neuronal nitric oxide synthase: Structure-activity studies and demonstration of in vivo activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 2858-2871.
- [166] Chen X. X., Gao F., Wang Q., Huang X., Wang D. (2014): Design, synthesis and biological evaluation of paclitaxel – mimics possession only the oxetane D-ring and side chain structures. *Fitotherapia*, **92**, 111-115.
- [167] Gadekar P. K., Roychowdhury A., Kharkar P. S., Khedkar V. M., Arkile M., et al.

(2016): Design, synthesis and biological evaluation of novel azaspiro analogs of linezolid as antibacterial and antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **122**, 475-487.