



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Příprava derivátů pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu s potenciální  
CDK inhibiční aktivitou**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Jakub Havlásek</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2018

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jakub Havlásek
Název práce	Příprava derivátů pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinu s potenciální CDK inhibiční aktivitou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů a CRH
Vedoucí práce	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Diplomová práce se zaměřuje na syntézu pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů, které mají potenciální inhibiční aktivitu vůči cyklin-dependentním kinázám. Teoretická část shrnuje základní poznatky o cyklin-dependentních kinázách a jejich nejvýznamnějších inhibitorech, dále pak obsahuje přehled významných purinových bioisosterů ve vztahu k cyklin-dependentním kinázám a především se zaměřuje na doposud publikované informace týkající se biologické aktivity a syntézních přístupů pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinů. Experimentální část se věnuje syntézním postupům vedoucí k přípravě nových pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů a uvádí také inhibiční a antiproliferační aktivitu vybraných derivátů.
Klíčová slova	cyklin-dependentní kinázy, inhibitory cyklin-dependentních kináz, purinové bioisostery, pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triaziny
Počet stran	154
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Bc. Jakub Havlásek
Title of thesis	The preparation of derivatives of pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazine with potential CDK inhibitory activity
Type of thesis	Master's
Department	Laboratory of Growth Regulators and CRH
Supervisor	RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>This thesis focuses on the synthesis of pyrazolo[1,5-<i>a</i>]-1,3,5-triazine derivatives, which have potential inhibitory activity against cyclin-dependent kinases. The theoretical part summarizes the basic knowledge about cyclin-dependent kinases and their most important inhibitors, further includes a summary of significant purine bioisosteres in relation to cyclin-dependent kinases, and focuses primarily on the previously published information about biological activity and synthesis approaches of pyrazolo[1,5-<i>a</i>]-1,3,5-triazines. The experimental part deals with synthesis procedures leading to the preparation of new pyrazolo[1,5-<i>a</i>]-1,3,5-triazine derivatives and also shows the inhibitory and antiproliferative activity of selected derivatives.</p>
Keywords	cyclin-dependent kinases, inhibitors of cyclin-dependent kinases, purine bioisosteres, pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazines
Number of pages	154
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Tomáše Guckého, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne 9. 5. 2018

.....

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za odborné vedení práce, užitečné rady a ochotu, se kterou se mi při řešení dané problematiky věnoval, dále pak Mgr. Kristýně Vlkové, Mgr. Vlastě Matuškové, Františku Škařupovi a dalším pracovníkům pracoviště CRH, Oddělení chemické biologie a genetiky za cenné rady a pomoc v rámci laboratorní práce. Poděkování patří také Mgr. Haně Omámkové za ochotu při poskytování HPLC-MS spekter požadovaných vzorků a Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D. za otestování biologické aktivity vybraných látek.

## Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod a cíle práce	10
2 Teoretická část	11
2.1 Cyklin-dependentní kinázy	11
2.1.1 Cyklin-dependentní kinázy a evoluční kontext	14
2.1.2 Strukturální vlastnosti cyklin-dependentních kináz a cyklinů	16
2.1.3 Základní prvky aktivace a inhibice cyklin-dependentních kináz	19
2.1.4 Cyklin-dependentní kinázy a proliferační onemocnění	20
2.1.5 Inhibitory cyklin-dependentních kináz	21
2.2 Purinové bioisostery	37
2.3 Pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triaziny	43
2.3.1 Biologická aktivita	43
2.3.2 Syntetické přístupy vedoucí k přípravě pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinového heterocyklu	59
3 Experimentální část	70
3.1 Materiál a metody	70
3.2 Syntéza pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů	72
3.2.1 Příprava 4-cyklopentyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-aminu	72
3.2.2 Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup A)	76
3.2.3 Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B1)	78
3.2.4 Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B2)	85
3.3 Výsledky	90
3.3.1 Syntéza pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů	90
3.3.2 Biologická aktivita vybraných derivátů	98
4 Diskuze	99
4.1 Syntéza pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů	99

4.1.1	Příprava 4-cyklopentyl-1 <i>H</i> -pyrazol-5-aminu .....	99
4.1.2	Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup A)...	101
4.1.3	Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B1) .	103
4.1.4	Příprava pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B2) .	107
4.2	Biologická aktivita vybraných derivátů.....	108
5	Závěr .....	110
	Použitá literatura.....	111

## Seznam použitých zkratk

- 5-HT – 5-hydroxytryptamin  
ABC – *ATP-binding cassette* transportéry  
ABCG2 – *breast cancer resistance protein 2*  
ADP – adenosindifosfát  
AHCY – *S*-adenosylhomocysteináza  
AII – angiotenzin II  
AMP – adenosinmonofosfát  
AR – adenosinový receptor  
AR – androgenní receptor  
ATP – adenosintrifosfát  
BCL2 – *B-cell lymphoma protein 2*  
CAK – CDK-aktivační kináza  
CaMKII – Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentní protein kináza II  
cAMP – cyklický adenosintrifosfát  
CB – kanabinoidní receptor  
CDK – cyklin-dependentní kináza  
CDKL – *CDK-like* kinázy  
cGMP – cyklický guanosinmonofosfát  
Cip/Kip – *CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*  
CK – kasein kináza  
CLK – *CDC-like* kinázy  
COSMIC – *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*  
CRF – faktor uvolňující kortikotropin  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
DYRK – *dual-specificity tyrosine-regulated* kinázy  
ER – estrogenní receptor  
ERK – extracelulárním signálem regulované kinázy  
ES+ – ionizace elektrosprejem  
GI<sub>50</sub> – 50% inhibice buněčného růstu  
GSK – glykogensyntáza kinázy  
GTP – guanosintrifosfát  
HER – receptor pro lidský epidermální růstový faktor



HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie  
HPV – lidský papillomavirus  
IAP – proteiny inhibující apoptózu  
IC<sub>50</sub> – poloviční maximální inhibiční koncentrace  
IKK – IκB kináza  
INK4 – inhibitory CDK4  
JAK/STAT – Janus kináza/*signal transducer of activation*  
K<sub>i</sub> – inhibiční konstanta  
MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy  
Mcl-1 – *myeloid cell leukemia protein 1*  
MIC – minimální inhibiční koncentrace  
MNEC – maximální neefektivní koncentrace  
MPF – mitózu podporující faktor  
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina  
MS – hmotnostní spektrometrie  
NAD – nikotinamidadeninukleotid  
NADP – nikotinamidadeninukleotidfosfát  
NF-κB – nukleární faktor kappa B  
NF-κB – nukleární faktor κB  
NMR – nukleární magnetická rezonance  
NSAI – nesteroidní inhibitor aromatázy  
NSCLC – nemalobuněčný plicní karcinom  
ORR – *overall response rate*  
P2Y<sub>1</sub> – purinergní receptor 2Y<sub>1</sub>  
PAK – p21-aktivovaná proteinkináza  
PDE – nukleotidfosfodiesteráza  
PDXK – pyridoxal kináza  
PKC – proteinkináza C  
pRb – retinoblastomový protein  
PTEF-b – transkripční elongační faktor B  
RCK – *ros-cross hybridizing* kinázy  
RNAPII – RNA polymeráza II  
SNP – nitroprusid sodný  
SRPK – *SR-rich protein* kinázy

TFIIH – transkripční faktor II H

TGF- $\beta$  – transformující růstový faktor  $\beta$

TLC – tenkovrstevná chromatografie

TLS – syndrom nádorového rozpadu

TP – thymidin fosforyláza

UV – ultrafialová záření

VSMC – hladká svalovina cév

XO – xantin oxidáza

## 1 Úvod a cíle práce

Díky rozvoji molekulárně-biologických metod došlo v 70. letech minulého století k identifikaci nové rodiny enzymů, které označujeme jako cyklin-dependentní kinázy (Nurse, 1975; Hartwell a kol., 1974). Tyto enzymy zodpovídají za kontrolu stěžejních dějů souvisejících s kontrolou buněčného cyklu, transkripce genů a dalších biologických procesů (Law a kol., 2015). Deregulace a mutace spojené s cyklin-dependentními kinázami jsou příčinou vzniku nejrůznějších chorob a patologických stavů zahrnujících zejména různé formy nádorových onemocnění (Deshpande a kol., 2005). V posledních letech je tak věnována velká pozornost látkám s potenciální inhibiční aktivitou vůči cyklin-dependentním kinázám, které by mohly vést k potlačení nekontrolovatelné buněčné proliferace (Balakrishnan a kol., 2016).

Velmi nadějnou skupinou inhibitorů cyklin-dependentních kináz představují látky odvozené od purinu a jeho strukturních analogů (Veselý a kol., 1994; Kryštof a kol., 2002; Tang a kol., 2005). Mezi purinové analogy s potenciální inhibiční aktivitou vůči cyklin-dependentním kinázám patří mimo jiné také pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny, které vykazují biologickou aktivitu nejen v rámci enzymatické inhibice, ale fungují také jako ligandy některých receptorů (Raboison a kol., 2002a; Bettayeb a kol., 2008; Popowycz a kol., 2009).

Cílem teoretické části této diplomové práce je zpracovat literární rešerši zahrnující základní informace o cyklin-dependentních kinázách a jejich nejvýznamnějších inhibitech, dále pak uvést přehled důležitých purinových bioisosterů s důrazem na biologickou aktivitu doposud připravených a popsáných pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů a shrnout syntetické přístupy vedoucí k přípravě pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu.

Cílem experimentální části je příprava nových pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů a jejich charakterizace prostřednictvím fyzikálně-chemických metod. Jejím součástí je také zhodnocení biologické aktivity vybraných derivátů.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Proteinkinázy představují důležitou část proteomu člověka, která obsahuje více než 500 jednotlivých členů a nese souhrnné označení *kinome* (Manning a kol., 2002). Tato velká rodina enzymů obecně katalyzuje jednu z nejdůležitější post-translačních modifikací - přenos  $\gamma$ -fosfátu z molekuly adenosintrifosfátu (ATP) na serinová, threoninová nebo tyrosinová residua proteinového substrátu, a je tak nepostradatelnou součástí intracelulární signalizace (Blume-Jensen a Hunter, 2001).

Specifickou skupinou proteinkináz jsou tzv. cyklin-dependentní kinázy (CDK). Tyto kinázy bývají vzhledem k aminokyselinové sekvenci své kinázové domény řazeny do skupiny tzv. CMGC kináz, kam kromě CDK patří MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy), GSK (glykogensyntáza kinázy), DYRK (*dual-specificity tyrosine-regulated* kinázy), RCK (*ros-cross hybridizing* kinázy), CDKL (*CDK-like* kinázy), SRPK kinázy (*serin-arginin rich* proteinkinázy), CLK (*CDC-like* kinázy) a CK2 (kasein kináza 2), (Manning a kol., 2002; Broekhuis a kol., 2014). CDK byly poprvé identifikovány nezávisle při genetických a biochemických studiích u mořských hvězdic, žab a kvasinek a úspěšně klonovány v sedmdesátých a osmdesátých letech minulého století (Nurse, 1975; Hartwell a kol., 1974; Lee a Nurse, 1987; Labbe a kol., 1988; Lohka a kol., 1988; Labbe a kol., 1989a).

Pro CDK je obecně charakteristické, že v monomerní podobě nejsou enzymaticky aktivní, aktivitu vykazují pouze ve formě heterodimeru, kdy tvoří komplex se svou regulační podjednotkou – cyklinem (Hunt, 1991; Morgan, 1997). Cykliny dostaly jméno podle periodického charakteru své exprese a degradace během buněčného cyklu (Evans a kol., 1983). Aktivní komplexy CDK/cyklin významně regulují buněčný cyklus a buněčné dělení, fosforylací nejrůznějších substrátů ovlivňují replikaci DNA, podílí se na kondenzaci chromatinu, vytváření mitotického vřeténka nebo rozpadu obalu buněčného jádra (Morgan, 1995; Nurse, 2000). Přestože byly CDK prvně spojovány jen s řízením samotného buněčného cyklu, dnes je již zřejmé, že zodpovídají také za mnohé další biologické funkce včetně například transkripce genů, metabolických procesů, zárodečného vývoje nebo tkáňové diferenciaci (Lim a Kaldis, 2013; Malubres a Barbacid, 2005). U člověka bylo popsáno 21 různých CDK a téměř 30 cyklinů (Cao a kol., 2014; Malubres a Barbacid, 2005). Většina z nich včetně příslušných funkcí je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Přehled jednotlivých CDK s příslušnými vazebnými partnery včetně jejich významných biologických funkcí (Ho a Dowdy, 2002; Coudreuse a Nurse, 2010; Jackman a kol., 2003; Chen a kol., 2009; Marais a kol., 2010; Li a kol., 2012; Ali a kol., 2011; Hofmann a Livingston, 1996; Ren a Rollins, 2004; Chen a kol., 2011; Huertas a kol., 2008; Chen a kol., 2010; Lu a kol., 2014; Kaneko a kol., 2010; Wei a kol., 2011; Wu a Zhang, 2011; Lavoie a St-Pierre, 2011; Sherr a Roberts, 2004; Coverley a kol., 2000; Tomashevski a kol., 2010; Aggarwal a kol., 2010; Smith a kol., 2001; Nikolic a kol., 1996; Lilja a kol., 2001; Cheung, 2012; Fu a kol., 2004; Tudhope a kol., 2012; Fisher, 2005; Szilagyí a Gustafsson, 2013; Firestein a kol., 2008; Akoulitchev a kol., 2000; Zhao a kol., 2012; Wang a Fischer, 2008; Yu a kol., 2010; Li a kol., 1995; Guen a kol., 2013; Iorns a kol., 2008; Hu a kol., 2003; Chen a kol., 2006; Bartkowiak a kol., 2010; Blazek a kol., 2011; Cheng a kol., 2012; Chen a kol., 2007; Davidson a kol., 2009; Ou a kol., 2010; Park a kol., 2011; Mikolcevic a kol., 2012; Arif, 2012; Zhang a kol., 2015; Kozar a Sicinski, 2005; Wang a kol., 2017; Ebmeier a kol., 2017; Fisher, 2005; Ganuza a kol., 2012; Galbraith a kol., 2017; Zhu a kol., 2014; Fu a kol., 1999; Napolitano a kol., 1999; Yeh a kol., 2013; Guen a kol., 2016; Wang a kol., 2016; Park a kol., 2014; Graeser a kol., 2002; Liu a kol., 2006; Chen a kol., 2012; Shimizu a kol., 2014; Hirose a kol., 1997; Barone a kol., 2016; Matsuda a kol., 2014; Audetat a kol., 2017; Wohlbold a kol., 2006; Feng a kol., 2011; Yang a kol., 2013; Snouffer a kol., 2017).

CDK	vazebný partner	fáze buněčného cyklu	transkripční funkce	další biologické funkce
CDK1	cyklin B	mitóza	+	regenerace kmenových buněk, oprava DNA, epigenetická regulace
CDK2	cyklin E cyklin A	G1/S tranzice S fáze	+	regenerace kmenových buněk, epigenetická regulace
CDK3	cyklin C	G0/G1 a G1/S tranzice	+	oprava DNA
CDK4	cyklin D	G1 fáze	-	epigenetická regulace, stabilizace genomu
CDK5	p35, p39, p67, cyklin D, E, G1 a I	G1 fáze	+	epigenetická regulace, neuronální funkce, syntéza glykogenu, sekrece inzulinu, opravy DNA
CDK6	cyklin D	G1 fáze	+	hematopoéza, glykolýza
CDK7	cyklin H, Mat1	aktivace CDK, progres G1 fáze	+	modifikace chromatinu, embryonální vývoj

Tab. 1: Pokračování.

CDK8	cyklin C	-		+	inhibice lipogeneze, signalizace spojená s Wnt/ $\beta$ -cateninem a p53, glykolýza
CDK9	cyklin T1, T2a, T2b, K	-		+	(cyklin T) oprava DNA (cyklin K), modifikace aktivity glukokortikoidního receptoru
CDK10	cyklin M		G2/M tranzice	+	neurogeneze, regulace aktinu a ciliogeneze
CDK11	cyklin L	-		+	pre-mRNA <i>splicing</i>
CDK12	cyklin K a L	-		+	(cyklin K) pre-mRNA <i>splicing</i> (cyklin L), oprava DNA (cyklin K)
CDK13	cyklin K a L	-		-	pre-mRNA <i>splicing</i> (cyklin L)
CDK14	cyklin Y		mitóza, G2/M tranzice	-	signalizace spojená s Wnt/ $\beta$ -cateninem
CDK15	-	-		-	aktivace proteinu survivinu
CDK16	cyklin Y	-		-	regulace spermatogeneze, transport synaptických proteinů, růst neuritů, vezikulární transport, metabolismus glukózy, diferenciaci svalových vláken
CDK17	-	-		-	diferenciaci neuronů
CDK18	cyklin A, protein kináza A	-		-	ochranná funkce vůči replikačnímu stresu a nestabilitě genomu
CDK19	-	-		-	proliferační funkce některých typů buněk, metabolismus cholesterolu, regulace p53

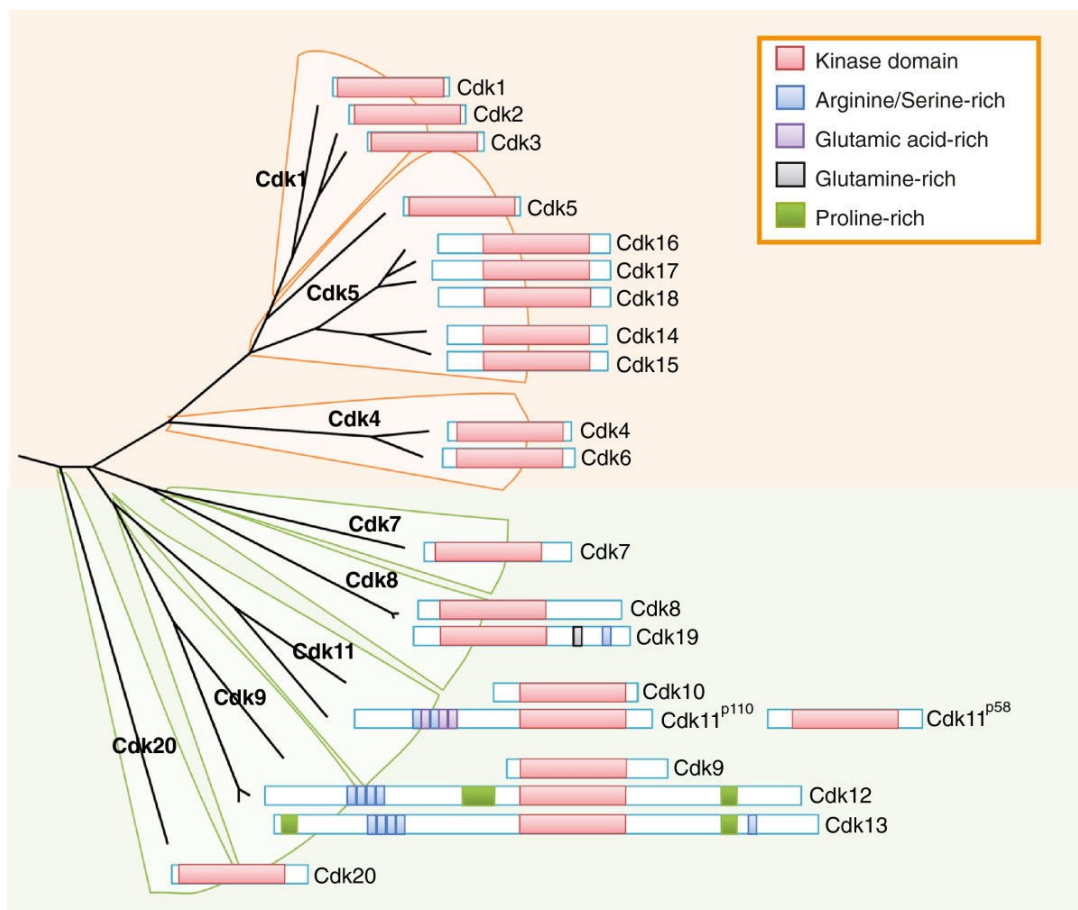
Tab. 1: Pokračování 2.

CDK20	cyklin H	-	-	regulace s $\beta$ -kateninem a <i>T-cell</i> faktorem, regulace embryonálního vývoje, ciliogeneze, signalizace	signální dráhy
-------	----------	---	---	---	----------------

### 2.1.1 Cyklin-dependentní kinázy a evoluční kontext

Genetické studie u vývojově nižších organismů naznačují, jak probíhala evoluční cesta CDK a cyklinů. U pučících kvasinek se nalézá šest typů CDK, které jsou rozděleny do dvou skupin. První skupinou jsou CDK schopné vázat více různých cyklinů a ovlivňují průběh buněčného cyklu. Druhá skupina CDK vyžaduje vazbu vždy jen jednoho určitého cyklinu, tyto komplexy cyklin-CDK pak regulují transkripci (Liu a Kipreos, 2000). V případě kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, CDK Cdc28 a Pho85, spjaté s buněčným cyklem, váží devět až deset různých cyklinů. Tato skutečnost vede k tvorbě dynamického charakteru jejich regulace a schopnosti fosforylovat vícero typů substrátů. Naopak CDK Kin28, Srb10, Bur1 a Ctk1 jsou každá aktivována specifickým cyklinem a podílí se na regulaci genové transkripce (Ho a kol., 1999; Cao a kol., 2014; Liu a Kipreos, 2000). V průběhu evoluce počet CDK narůstá, zejména pak ty, které se přímo účastní řízení buněčného cyklu (Cao a kol., 2014; Choi a Anders, 2014).

Z evolučního hlediska lze známé CDK zařadit do osmi podrodin: CDK1, CDK4, CDK5, CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20. Podrodiny CDK1, CDK4, CDK5 jsou odvozeny z kvasinkových CDK regulujících průběh buněčného cyklu a podrodiny CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20 z CDK, které mají u kvasinek význam v rámci genové transkripce (Cao a kol., 2014; Liu a Kipreos, 2000). Fylogenetický strom podrodin CDK, které byly popsány u savců, je zobrazen na Obr. 1.



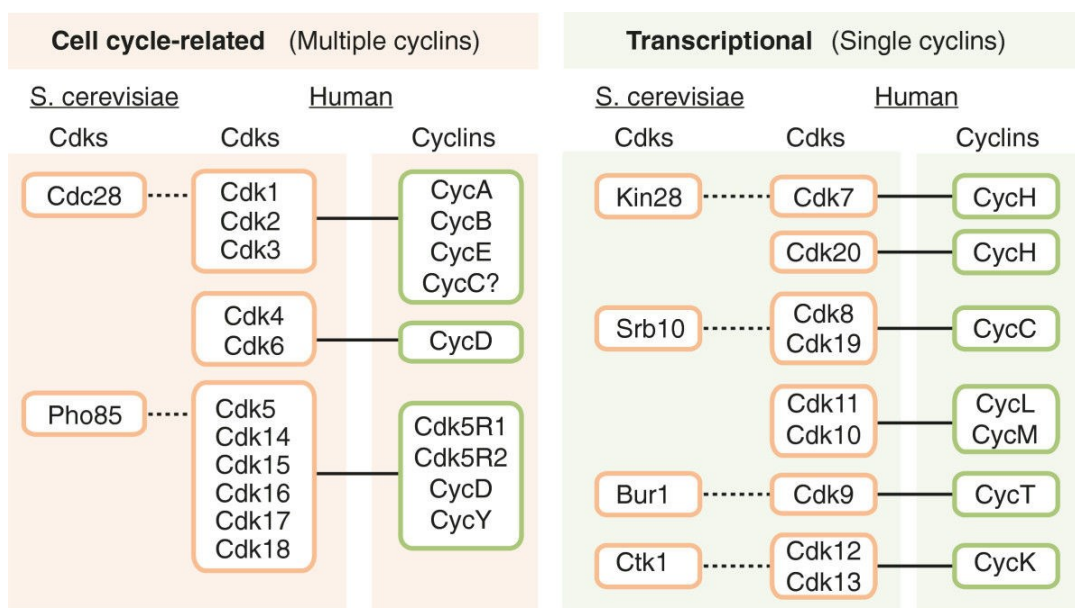
Obr. 1: Fylogenetický strom savčích podrodin CDK. Růžové pole obsahuje CDK řídící zejména buněčný cyklus, zatímco zelené pole CDK s významnou transkripční funkcí. U jednotlivých CDK je na konci větvi zobrazena přítomnost charakteristických domén (Malumbres, 2014).

Sekvenační a funkčně genomické studie ukazují, že savčí CDK1 je ortologní vůči kvasinkové kináze Cdc28 a jako jediná je nepostradatelná pro správnou funkci buněčného cyklu (Santamaria a kol., 2007). Savčí CDK5 je pak homologem kinázy Pho85. Pho85 nemá pro buněčný cyklus u kvasinek esenciální význam, je ale potřebná pro regulaci genové exprese, metabolické procesy a morfogenezi, znatelně také ovlivňuje buněčné stárnutí (Huang a kol., 2007).

Cyklin-dependentní kinázy regulující transkripci jsou obecně mnohem více evolučně funkčně i sekvenčně konzervované. U kvasinkové kinázy Kin28 bylo zjištěno, že spolu s lidskou CDK7 tvoří podjednotky transkripčního faktoru TFIIF, který se podílí na iniciaci transkripce prostřednictvím fosforylace RNA polymerázy II (RNAPII). Kvasinková kináza Srb10 je ortologní vůči lidským kinázám CDK8 a CDK19 a má význam pro regulaci RNAPII při transkripci (Carlsetn a kol., 2013). CDK9 člověka je ortologem kvasinkové Bur1 (Kohoutek a Blazek, 2012; Cao a kol., 2014). Evoluční vztahy u podrodin CDK11 a CDK20 nejsou doposud zcela jasné,



ačkoliv jejich proteinové struktury také vykazují vysoký stupeň konzervace (Cao a kol., 2014). Evoluční vztahy mezi kvasinkovými a lidskými CDK jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Fylogenetický vztah CDK (s příslušnými cykliny) podílejících se na řízení buněčného cyklu (růžový sloupec) a genové transkripce (zelený sloupec) u *Saccharomyces cerevisiae* a člověka (Malumbres, 2014).

Cykliny obecně nevykazují tak velkou sekvenční podobnost jako CDK. U člověka se nachází 29 cyklinů, které se člení do 16 podrodin a 3 větších skupin (Ma a kol., 2013; Cao a kol., 2014). První velká skupina (skupina cyklin B) zahrnuje cykliny A, B, D, E, F, G, J, I a O, druhá skupina (skupina cyklinu Y) obsahuje cykliny, které jsou vazebnými partnery podrodiny CDK5 a třetí skupina (skupina cyklinu C) zahrnuje cykliny C, H, K, L, T, ty jsou vazebnými partnery CDK s transkripční funkcí (Cao a kol., 2014).

### 2.1.2 Strukturální vlastnosti cyklin-dependentních kináz a cyklinů

Pro kinázy spadající do skupiny CMGC kináz obecně platí, že se jedná o prolinem řízené serin/threonin specifické proteinkinázy (*proline-directed serine/threonine-protein kinases*). Charakteristická preference vůči aminokyselinové sekvenci S/T-P-X-K/R je zřejmě důsledkem přítomnosti hydrofobní kapsy v blízkosti katalytického místa, které po akomodaci prolinu (posunutí o 1 pozici „dopředu“), umožňuje fosforylaci daného substrátu (Manning a kol., 2002; Echaliier a kol., 2010). Tato vlastnost se ovšem netýká CDK4, některých CDK s transkripční funkcí a CDK7 a CDK9, které jsou schopné fosforylace substrátu bez změny aminokyselinové sekvence (posunu prolinu).

Cyklin-dependentní kinázy obecně nabývají podoby aminokyselinové sekvence o 250 členech obsahující pouze katalytickou serin/threonin kinázovou doménu, až po složité proteinové struktury o více než 1 500 členech, které mohou obsahovat další specifické struktury různé velikosti navázané na amino-koncové nebo karboxy-koncové části (Lolli, 2010; Echaliere a kol., 2010).

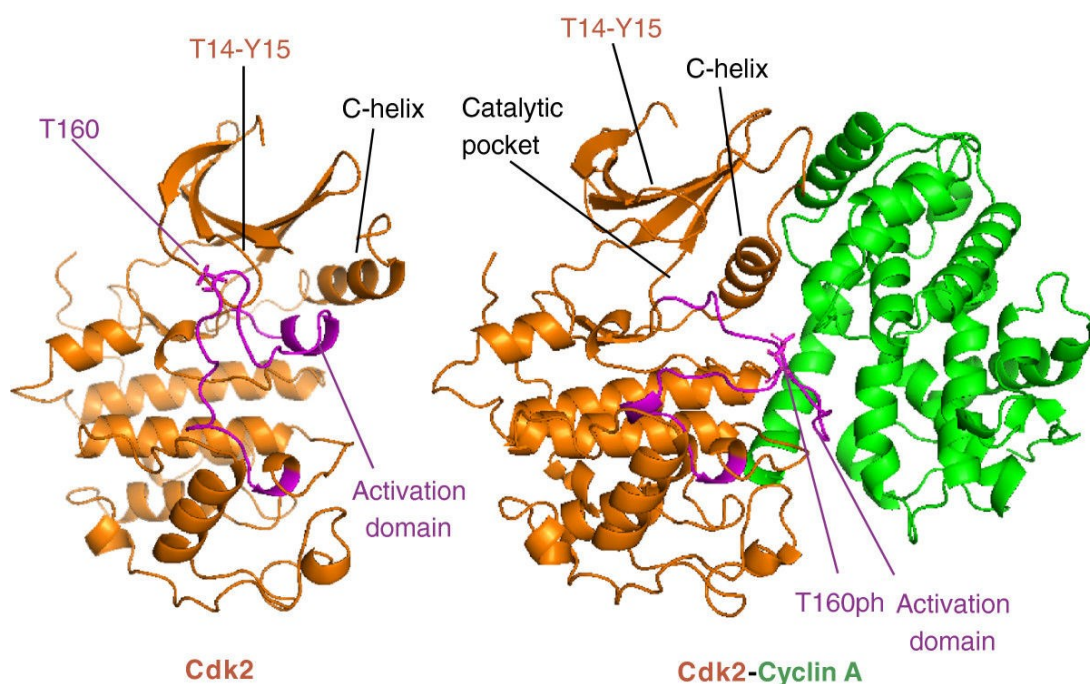
Jako většina kináz mají CDK dvoj-laločnatou strukturu. U amino-koncového laloku jsou bílkoviny uspořádány do sekundární struktury beta-skládaného listu, karboxy-koncový lalok naopak tvoří alfa-helixy. Aktivní místo enzymu je uloženo mezi dvěma laloky. ATP potřebné pro proces fosforylace je lokalizováno uvnitř struktury, fosfátové skupiny jsou ale orientovány směrem ven (Kornev a Taylor, 2010; Echaliere a kol., 2010, Lolli, 2010).

Amino-koncový lalok dále obsahuje na glycin bohatý inhibiční element (*glycine-rich inhibitory element*), který je označován jako tzv. G-smyčka (*G-loop*), a jeden specifický majoritní helix (tzv. C-helix) – v případě CDK2 se jedná o specifickou sekvenci aminokyselin označovanou jako PSTAIRE (Child a kol., 2010; Echaliere a kol., 2010). V karboxy-koncovém laloku se nachází aktivační segment, který se rozprostírá od tzv. DFG-motivu (v případě CDK2 se jedná o aminokyselinu D145) po APE-motiv (aminokyselina E172 u CDK2) a obsahuje fosforylačně senzitivní residuum (aminokyselina T160 u CDK2) – tzv. T-smyčku (*T-loop*). V monomerní formě (bez navázaného cyklinu) T-smyčka blokuje katalytické místo a CDK tak nevykazuje enzymatickou aktivitu. Aktivační segment v karboxy-koncovém laloku má také význam pro připojení fosfo-akceptorové oblasti (Ser/Thr) substrátu (Lolli, 2010; Echaliere a kol., 2010; Pavletich, 1999).

Některé CDK kromě základní konzervované kinázové domény obsahují také další specifické domény plnící různé funkce. Například CDK16, CDK17 a CDK18, obsahující v oblasti C-helixu specifickou aminokyselinovou sekvenci PCTAIRE, jsou charakteristické poměrně konzervovanou katalyticky účinnou doménou ohraničenou amino-koncovou a karboxy-koncovou extenzí zapojující se do vazby s cyklinem. Fosforylace amino-koncové oblasti brání navázání cyklinu Y. Jedná se tak o další mechanismus pro regulaci tvorby aktivních komplexů (Mikolcevic a kol., 2012). V případě CDK12 a CDK13, které jsou typické PITAIRE motivem v aminokyselinové sekvenci, je kinázová doména lokalizována v centrální části, v amino-koncové oblasti se pak nachází sekvence bohatá na arginin a serin. Tento *Arg/Ser-rich motif* slouží jako místo, kde dochází k sestavování specifických faktorů a regulátorů. Kinázy CDK12

a CDK13 mají také sekvence bohaté na prolin (*Pro-rich motifs*) lokalizované v karboxy-koncové části, kde dochází k vazbě různých regulačních proteinů (Kohoutek a Blazek, 2012).

Cykliny představují rodinu přibližně 30 proteinů, jejichž velikost se pohybuje od 35 do 90 kDa. Pro jejich strukturu je charakteristická přítomnost tzv. cyklin boxu, ten představuje doménu skládající se asi ze 100 aminokyselinových residuí, které společně vytvářejí specifický útvar tvořený pěti alfa-helixy. U některých cyklinů se setkáváme se dvěma cyklin boxy, amino-koncový box umožňuje připojení k molekule CDK a karboxy-koncový box je důležitý pro správné poskládání molekuly cyklinu (Ma a kol., 2013). Přítomnost cyklin boxu byla také například prokázána u retinoblastomového proteinu (pRb) nebo transkripčního faktoru TFIIB (Ma a kol., 2013; Cao a kol., 2014). Dále je potřeba zdůraznit, že cykliny ovlivňují subcelulární lokalizaci CDK - díky tzv. NES a NLS sekvencím je regulován transport mezi jádrem a cytoplazmou. Cykliny také přispívají k výběru substrátu prostřednictvím specifických vazebných míst, tzv. *docking sites* (Schulman a kol., 1998). Základní struktura molekuly CDK2 spolu s cyklinem A je zobrazena na Obr. 3.



Obr. 3: Třidimenzionální zobrazení struktury molekuly CDK2 v neaktivní monomerní formě a v podobě aktivního heterodimeru (oranžová barva – molekula CDK2, zelená – molekula cyklinu A, fialová – aktivační doména, C-helix – amino-koncová část molekuly CDK, T160 - aminokyselina Thr160 před fosforylací, T160ph - aminokyselina Thr160 po fosforylací, kdy dochází k aktivaci molekuly CDK, T14 a Y15 – specifická aminokyselinová residua Thr14 a Tyr15 v G-loop, které mají inhibiční význam), (Malumbres, 2014).

### 2.1.3 Základní prvky aktivace a inhibice cyklin-dependentních kináz

Proces vedoucí k aktivaci začíná ve chvíli, kdy se k molekule CDK naváže příslušný cyklin. C-helix (amino-koncová část molekuly CDK) se začne stáčet proti jednomu specifickému helixu cyklinu, a to převážně prostřednictvím hydrofobních interakcí. Tato asociace cyklinu s C-helixem CDK vede k rotaci osy tohoto uspořádání a vzniku dalších interakcí, které jsou součástí aktivního ATP-vazebného místa. Cyklin dále způsobí, že se aktivační segment v karboxy-koncovém laloku vzdálí od katalytického místa CDK a aminokyselina threonin ve specifické pozici se stane přístupná pro následnou fosforylaci. Aktivace komplexu cyklin-CDK fosforylací je uskutečněna tzv. CAK kinázou (CDK-aktivační kináza), kterou je kináza CDK7. Fosforylovaný threonin má význam pro stabilizaci aktivovaného heterodimerního komplexu cyklin-CDK (Echalier a kol., 2010; Morgan, 1995; Pavletich, 1999; Kaldis, 1999).

Plocha, kde je cyklin s CDK v přímém kontaktu, se u jednotlivých CDK liší. Například CDK2 s cyklinem A jsou spolu v přímém spojení jak v rámci amino-koncového, tak karboxy-koncového laloku. Oproti tomu u CDK4 a cyklinu D je kontakt omezen pouze na amino-koncový lalok, cyklin zde navíc nemá vliv na vznik aktivní konformace enzymu. Aktivní místo je tak substrátu nepřístupné i přes přítomnost cyklinu (Day a kol., 2009; Takaki a kol., 2009). U některých CDK, jako například CDK5, není potřeba fosforylace v aktivačním segmentu, která by vedla k aktivaci enzymu. Tyto kinázy dokáží získat vhodnou konformaci jen s pomocí vazebných interakcí (Echalier a kol., 2010).

Inhibice kinázové aktivity je spojena s G-smyčkou (*G-loop*) nacházející se v amino-koncovém laloku enzymu. *G-loop* obsahuje specifická aminokyselinová rezidua, při jejichž fosforylaci je aktivita enzymu potlačena. V případě CDK2 se jedná o aminokyseliny Thr14 a Tyr15 (viz Obr. 3). Zde jsou Thr14 a Tyr15 fosforylovány prostřednictvím kináz Wee1 a Myt1, které tak brání dalšímu pokračování buněčného cyklu, například v důsledku poškození DNA (Gu a kol., 1992; Gu a kol., 1993). Pokud dojde k odstranění fosfátových skupin na Thr14 nebo Tyr15 pomocí fosfatáz rodiny Cdc25, je CDK opět aktivní a vede k další progresi buněčného cyklu (Timofeev a kol., 2010). Inhibiční fosforylace Thr14 a Tyr15 nezpůsobuje zásadní změny ve struktuře kinázy, ale potlačuje její aktivitu snížením afinity k danému substrátu (Gu a kol., 1992; Gu a kol., 1993; McGowan a Russell, 1993).

U CDK spjatých s buněčným cyklem existuje také negativní regulace pomocí vazby s malými proteiny, jedná se především o proteiny rodiny INK4 a Cip/Kip (Quereda a kol., 2016; Cerqueira a kol., 2014; Jeffrey a kol., 2000). Proteiny INK4 (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> a p19<sup>INK4d</sup>) jsou specifické pro podrodinu CDK4 (odtud nesou své jméno) a interagují s CDK v monomerní formě. Jejich funkce spočívá v tom, že narušují povrch molekuly cyklinu a ATP-vázací místo, a tak brání aktivaci CDK4 nebo CDK6 cykliny typu D (D1, D2 a D3) nebo CAK (Gil a Peters, 2006; Jeffrey a kol., 2000). Členové Cip/Kip (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) rodiny inhibitorů (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> a p57<sup>Kip2</sup>) interagují jak s molekulou CDK, tak cyklinu, a jsou tak schopny inhibovat i již aktivovaný heterodimerní komplex. Syntézou těchto proteinů tak vznikají další úrovně regulace CDK (Cerqueira a kol., 2014; Russo a kol., 1996; Sherr a Roberts, 1999; Gil a Peters, 2006).

#### **2.1.4 Cyklin-dependentní kinázy a proliferační onemocnění**

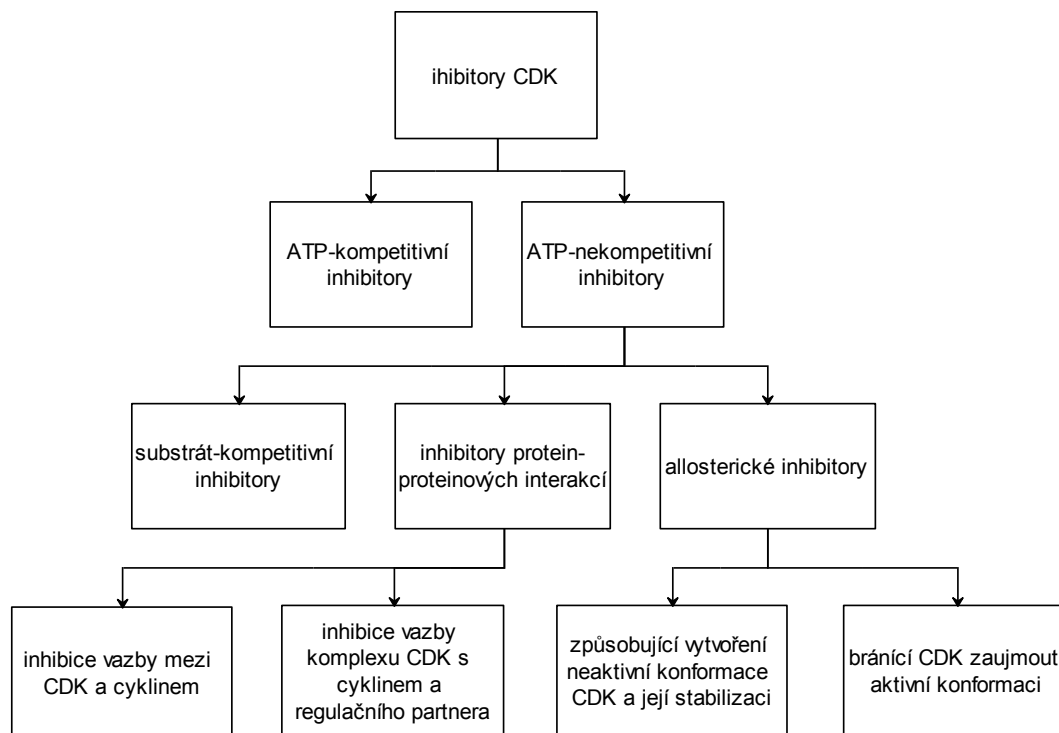
Vznik aktivního cyklin-CDK heterodimerního komplexu je za fyziologických podmínek přísně prostorově i časově kontrolovaným procesem. Přesto právě deregulace cyklinů spolu s CDK je často součástí vzniku nekontrolovatelné buněčné proliferace a rozvinutí různých forem rakoviny (Hall a Peters, 1996; Hanahan a Weinberg, 2000). Spolu s mutacemi proto-onkogenů, dávají mutace vedoucí k hyperaktivitě CDK buňkám selektivní růstovou výhodu. Mutace inaktivující regulátory kontrolních bodů buněčného cyklu nebo tumor-supresorové geny pak oproti tomu vedou k potlačení nebo ztrátě inhibiční funkce (Pérez de Castro a kol., 2007; Malumbres a Barbacid, 2009). Hyperaktivace komplexu cyklin-CDK může být důsledkem genové amplifikace, zvýšené exprese proteinů molekuly CDK nebo cyklinu, alternativního *splicingu* a exprese zkrácené podoby cyklinu, předčasné exprese a nesprávné lokalizace nebo konstitutivní aktivace heterodimeru blokadí jeho inaktivace proteiny s inhibiční funkcí (INK4, Cip/Kip), (Van Dross a kol., 2006; Husdal a kol., 2006; Harwell a kol., 2004; Kim a Diehl, 2009).

Souhrnný přehled mutací a aberací, které se týkají CDK a cyklinů, lze nalézt v databázi COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). Ta shrnuje všechny somatické mutace, které byly doposud identifikovány prostřednictvím sekvenování lidských tkáňových vzorků s různými formami rakovinných onemocnění ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/)).

### 2.1.5 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Vzhledem k zásadním funkcím v rámci regulace buněčného cyklu, transkripce a dalších metabolických procesů a také vztahu k rozvoji nejrůznějších rakovinných onemocnění, se CDK staly brzy významnými terapeutickými cíli v rámci vývoje nových protirakovinných léčiv. Zatímco dřívější přístup byl obecněji zaměřen na narušení DNA integrity a replikace v rakovinných buňkách prostřednictvím alkylačních látek, antimetabolitů, inhibitorů topoizomerázy nebo mitotického vřeténka, nové strategie zacílené na kinázy a s nimi spojené signální dráhy slibují větší účinnost a selektivitu k narušeným buňkám (Benson a kol., 2005; Shapiro, 2006).

Látky s inhibičním účinkem vůči CDK lze klasifikovat do více odvětví. Podle původu rozlišujeme přírodní a syntetické látky s různými chemickými strukturami. Na základě mechanismu účinku definujeme látky ATP-kompetitivní nebo ATP-nekompetitivní. ATP-nekompetitivní látky mohou představovat substrát-kompetitivní inhibitory, inhibitory protein-proteinových interakcí – a to mezi cyklin-dependentní kinázou a cyklinem, nebo heterodimerním komplexem CDK/cyklin a dalším regulačním partnerem (kromě některých malých molekul lze v tomto směru využít také látek odvozených od peptidů - peptidomimetik), nově se objevují také allosterické inhibitory, které způsobují tvorbu neaktivní konformace molekuly kinázy a stabilizují ji, nebo brání kináze zaujmout aktivní konformaci (Arris a kol., 2000; Davies a kol., 2002; Villerbu a kol., 2002; Jessen a kol., 2007; Pagliaro a kol., 2004; Bogoyevitch a kol., 2005; Morelli a kol., 2011; Giordano a kol., 2007; Zhang a kol., 2009; Eglen a Reisine, 2010; Andrews a kol., 2004; Corbi-Verge a Kim, 2016). Rozdělení inhibitorů CDK na základě mechanismu jejich účinku je schematicky znázorněno na Obr. 4. Vzhledem k různé úrovni specifity účinku existují inhibitory pan-selektivní nebo selektivní k jediné CDK (Jorda a kol., 2011; Weitensteiner a kol., 2013).

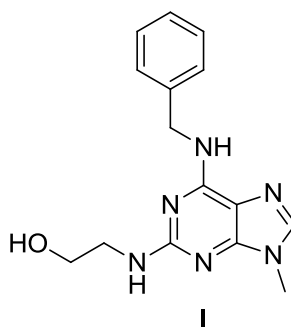


Obr. 4: Obecné rozdělení ihibitorů CDK podle mechanismu účinku.

Do první generace ihibitorů CDK patří beze sporu purinový analog 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin (Obr. 5), později pojmenován jako olomoucín (I). Na základě kinetické analýzy bylo zjištěno, že jeho CDK-ihibiční účinek je ATP-kompetitivního charakteru a dále se také ukázalo, že je nekompetitivním ihibitorem vůči histonu H1. V obou případech má ihibice lineární charakter. Ihibiční účinek olomoucínu se nejvíce projevil u komplexů kináz CDC2/cyklin B (respektive CDK1), CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E, CDK5/p35 a také u kinázy ERK1/MAP a jejího homologu p44MPK u mořské hvězdice. Hodnoty  $IC_{50}$  (poloviční maximální ihibiční koncentrace) zde byly 7, 7, 7, 3 a 25  $\mu$ M. Kinázy CDK4/cyklin D1 a CDK6/cyklin D3 nebyly vůči olomoucínu dostatečně senzitivní, hodnoty  $IC_{50}$  zde byly větší než 1 mM (Veselý a kol., 1994).

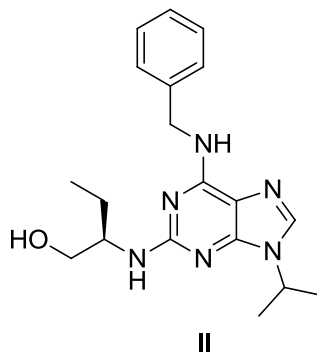
Působením olomoucínu došlo v *in vitro* podmínkách k ihibici aktivity tzv. MPF faktoru (*mitosis promoting factor*) v extraktu z metafázních vajíček žab rodu *Xenopus*, zastavení syntézy DNA u extraktu žabích vajíček nacházejících se v interfázi a ihibici účinku tzv. licenčního faktoru (*licensing factor*) odpovídajícího za to, že bude DNA molekula replikována pouze jednou za buněčný cyklus. V podmínkách *in vivo* v oocytech mořské hvězdice nastalo potlačení G2/M tranzice (Veselý a kol., 1994; Labbe a kol., 1989b; Dupre a kol., 2002; Ibarra a kol., 2008). Pozdější studie

také ukázaly, že olomoucín působí kromě G2/M tranzice také na G/S tranzici a pozastavuje buněčný cyklus v tomto bodě (Abraham a kol., 1995).



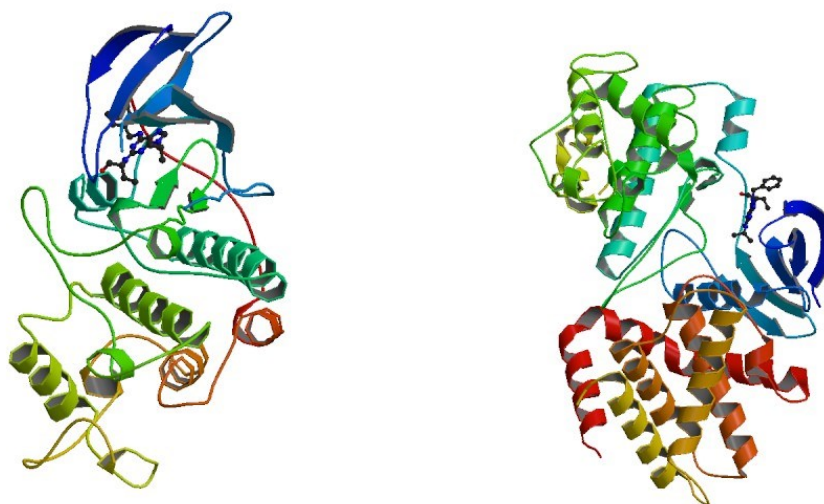
Obr. 5: Struktura CDK inhibitoru olomoucínu.

Další významný inhibitor CDK představuje roskovitin (**II**), který je také označován jako (R)-roskovitin, CY-202 nebo seliciclib, jeho systematický název je 2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin (Obr. 6). Jako slibný inhibitor CDK byl identifikován při studii účinku série látek odvozených od adeninu a substituovaných v pozicích C2, N6 a N9 vůči kináze CDK1 (CDC2/cyklinB). Jeho účinek je obdobně jako u olomoucínu založen na kompetici s molekulou ATP o ATP-vazebné místo CDK. Roskovitin interaguje s aminokyselinovými zbytky, které obklopují ATP-vazebné místo katalytické domény CDK. V případě kinázy CDK2 představuje interakce roskovitinu s molekulou kinázy tvorby dvou vodíkových můstků mezi atomy dusíku purinového heterocyklu (v pozicích C6 a N7) a aminokyselinou Leu83. Dále dochází k vytvoření další vodíkové vazby mezi atomem kyslíku a molekulou vody, benzyl roskovitinu je orientován směrem ven z vazebného místa (de Azevedo a kol., 1997; Bach a kol., 2005). Trojrozměrná krystalická struktura komplexu kinázy CDK2 a CDK5 s roskovitinem je zobrazena na Obr. 7.



Obr. 6: Struktura CDK inhibitoru roskovitinu (CY-202, seliciclib).





*Obr. 7: Zobrazení krystalické struktury komplexů roskovitinu s CDK2/cyklinE (vlevo) a roskovitinu s CDK5/p25 (vpravo), (de Azevedo a kol., 1997; Mapelli a kol., 2005).*

Inhibiční účinek roskovitinu byl prokázán v případě kináz CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9, kde se hodnoty  $IC_{50}$  pohybovaly mezi 0,2 až 0,7  $\mu\text{M}$ . Slabým inhibitorem je vůči kinázám CDK4, CDK6 a CDK8,  $IC_{50}$  zde nabývalo hodnot nad 100  $\mu\text{M}$ . Přehled hodnot  $IC_{50}$  u roskovitinu vůči jednotlivým CDK je uveden v Tab. 2. Kromě uvedených CDK interaguje roskovitin také například s PDXK (pyridoxal kináza) katalyzující fosforylaci pyridinových derivátů (Tang a kol., 2005).

Tab. 2: Hodnoty  $IC_{50}$  u jednotlivých CDK v případě inhibitoru roskovitinu (de Azevedo a kol., 1997; Meijer a kol., 1997; Schang a kol., 2002).

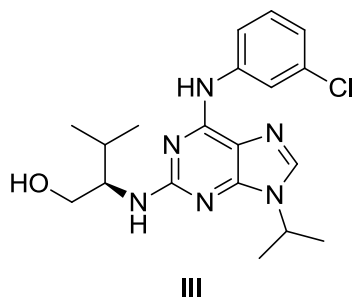
CDK se svým vazebným partnerem	hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu$ M]
CDK1/cyklinB	0,65
CDK2/cyklinA	0,70
CDK2/cyklinE	0,70
CDK4/cyklinD1	>100
CDK5/p25	0,16
CDK6/cyklinD3	>100
CDK7/cyklinH	0,46
CDK8/cyklinC	>100
CDK9/cyklinT1	0,60

V rámci studií zaměřených na účinek roskovitinu byly objeveny dva hlavní efekty na buněčné úrovni, a to jednak zastavení buněčného cyklu, a pak také indukce apoptózy (de Azevedo a kol., 1997; Raynaud a kol., 2005). Roskovitin blokuje průběh buněčného cyklu ve fázi G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> a S nebo přechod G<sub>2</sub>/M v závislosti na dávce, času a typu buněčné linie. Vzhledem k tomu, že jsou CDK důležité pro spoustu nejrůznějších signálních drah a procesů s nimi spojených, dochází kromě inhibice samotné aktivity CDK také například k potlačení drah Ras-MAPK, NF- $\kappa$ B, p53, estrogenního receptoru, Mcl-1 nebo JAK-STAT (Whittaker a kol., 2004; Dey a kol., 2008; Paprskářová a kol., 2009; Węsierska-Gądek a kol., 2011; Raje a kol., 2005; Mohapatra a kol., 2003).

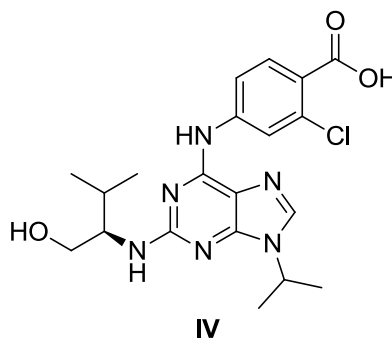
Antiproliferační i cytotoxické vlastnosti roskovitinu byly testovány jak v *in vitro*, tak v *in vivo* podmínkách v rámci preklinické i následných klinických fází (Tirado a kol., 2005; Hui a kol., 2009; Le Tourneau a kol., 2010; Gary a kol., 2016). Jako selektivní a netoxická terapeutická látka se roskovitin projevil například v rámci studie terapie HPV-positivního (lidský papillomavirus) karcinomu hlavy a krku (Gary a kol., 2016). Výsledky klinických fází nejsou oproti původně velice slibným výsledkům preklinických fází však příliš pozitivní, dochází jen k částečnému zlepšení a stabilizaci proliferativních procesů (Le Tourneau a kol., 2010; Benson a kol., 2007).

Sází se tak spíše na jeho použití v rámci kombinace s dalšími chemoterapeutiky (Cicenas a kol., 2015).

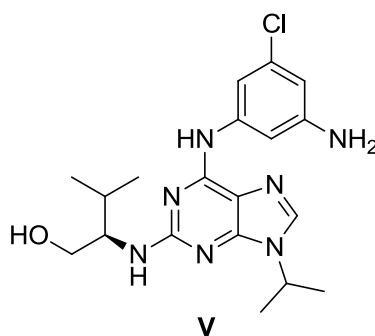
Velký terapeutický potenciál olomoucínu a roskovitínu vedl k tomu, že byla pozornost zaměřena na další varianty purinových analogů. Mezi významné zástupce trisubstituovaných purinů patří purvalanoly: 2-(1*R*-isopropyl-2-hydroxyethylamino)-6-(3-chloranilin)-9-isopropylpurin, respektive purvalanol A (**III**), (2*R*)-2-[[6-[(3-chlor-4-karboxyfenyl)amino]-9-(1-methylethyl)-9*H*-purin-2-yl]amino]-3-methyl-1-butanol, který je znám pod označením purvalanol B (**IV**), a aminopurvalanol (**V**), neboli (2*R*)-2-({6-[(3-amino-5-chlorfenyl)amino]-9-(propan-2-yl)-9*H*-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol (viz Obr. 8, 9 a 10), (Gray a kol., 1998; Villerbu a kol., 2002; Chang a kol., 1999).



Obr. 8: Struktura CDK inhibitoru purvalanolu A (NG60).



Obr. 9: Struktura CDK inhibitoru purvalanolu B (NG95).



Obr. 10: Struktura CDK inhibitoru aminopurvalanolu (NG97).

Obdobně jako roskovitin blokuje purvalanoly obecně buněčný cyklus v bodě G1/S nebo G2/M (Arisan a kol., 2014). Prvně byla u purvalanolové struktury zjištěna selektivní inhibiční účinnost proti kinázám CDK1 a CDK2 (Gray a kol., 1998). Následně se však projevil výrazný inhibiční účinek u dalších CDK a také například u kináz CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/kalmmodulin-dependentní protein kináza II), Erk1 a Erk2 (*extracellular signal-regulated* kinázy 1 a 2) a MAPK (Monaco a kol., 2004; Knockaert a kol., 2000; Knockaert a kol., 2002).

Purvalanol A (NG60) inhibuje kinázy CDK1/cyklin B, CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E, CDK4/cyklin D1 a CDK5/p35, IC<sub>50</sub> zde nabývá hodnot 4, 70, 35, 850 a 75 nM (Gray a kol., 1998). Nevratně zastavuje u rakovinných buněk průběh buněčného cyklu v G1 a G2 fázi, nemá ale vliv na syntézu DNA během S fáze. Během G1 fáze prokazatelně blokuje fosforylaci proteinu Rb. Zastavení cyklu v G1 a G2 fázi je reverzibilní, po odstranění inhibitoru buňky postupně dokončí svůj cyklus. Inhibiční účinek nebyl prokázán na transkripční úrovni (Villerbu a kol., 2002). Významný vliv na indukci buněčné smrti spojené s redukcí mitochondriální kapacity se podařilo prokázat při studii neuronů mozečku (Monaco a kol., 2004). Dále podporuje účinek SNP (nitroprusid sodný) v rámci indukci apoptózy prostřednictvím snížení hladiny exprese proteinu survivinu, který je exprimován ve většině nádorových buněk a má výrazný antiapoptotický efekt (Chao a kol., 2004). Purvalanol A snižuje nejen expresi proteinů rodiny IAP (*inhibitor of apoptosis protein*), kam spadá survivin, ale také proteinů rodiny BCL2 (Bcl-X<sub>L</sub> a Bcl-2), (Iizuka a kol., 2007). Antiproliferační účinek purvalanolu A v závislosti na koncentraci a času byl prokázán u buněk hipokampu ve spánkovém laloku mozku (Maćkowiak a kol., 2005). Postupně se ukazuje, že k indukci apoptózy působením purvalanolu A dochází prostřednictvím inhibice signální dráhy spojené s JAK2/STAT3 (Janus kináza 2/*signal transducer and activator of transcription 3*) a RNA polymerázy II, které jsou společně důležitou součástí regulace antiapoptotických proteinů (Iizuka a kol., 2008). Tento inhibitor ovlivňuje nejen průběh buněčného cyklu ve vztahu k aktivitě CDK, ale má také inhibiční vliv vůči kináze c-Src (nereceptorová tyrosin kináza) a s ní spojené buněčné transformaci (Hikita a kol., 2010). Purvalanol A působí spolu s dalším významným purinovým analogem olomoucinem II (viz dále) synergicky a zvyšuje cytostatický účinek mitoxantronu na buňky, u kterých byla prokázána exprese proteinu ABCG2 (*breast cancer resistance protein*), který patří mezi membránové transportní

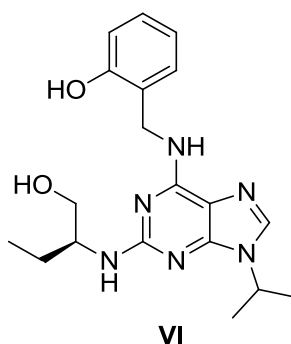
proteiny (tzv. ABC transportéry - *ATP-binding cassette transporters*), (Hofman a kol., 2012). Následná studie ukázala, že na rozdíl od olomoucínu II nejsou farmakokinetické vlastnosti purvalanolu A závislé na aktivitě ABC transportérů, a tak může být tento inhibitor využit v rámci terapie nádorů se zvýšenou expresí membránových transportérů s efluxní funkcí (Hofman a kol., 2013; Staud a kol., 2010). V případě rakovinných buněk prostaty bylo zjištěno, že purvalanol (a současně také roskovitin) indukuje proces apoptózy při nízkých cytotoxických koncentracích pomocí snížení membránového potenciálu mitochondrií. Purvalanolová struktura způsobuje indukci kaspázové aktivity spojenou se změnou regulace proteinů Bcl-2 a aktivací katabolismu polyaminů, jejichž zvýšená intracelulární hladina a modifikovaná regulace je charakteristická pro nádorové buňky prostaty (Arisan a kol., 2014). Při společné aplikaci purvalanolu A a cytostatika taxolu dochází k významnému potlačení exprese proteinů Bcl-2 a k aktivaci vnější cesty indukce apoptózy (*extrinsic cell death pathway*) prostřednictvím působení enzymů kaspázy 3 a kaspázy 8 v buňkách NSCLC (nemalobuněčný karcinom plic), (Chen a kol., 2017). Purvalanol A také indukuje prudké snížení exprese proteinu Mcl-1 v lidských neutrofilních granulocytech, monocytech a lymfocytech, ale aktivaci apoptózy způsobuje pouze u neutrofilních granulocytů, pro které je exprese proteinu Mcl-1 esenciální k přežití (Phoomvuthisarn a kol., 2018).

Purvalanol B (NG95) se od purvalanolu A se liší přítomností karboxylové skupiny, což vede k zvýšení polaritě molekuly a horšímu transportu buněčnou membránou (Villerbu a kol., 2002). Má inhibiční efekt vůči enzymatickým komplexům CDK1/cyklin B, CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E a CDK5/p35 o hodnotách  $IC_{50}$  6, 6, 9 a 6 nM. U ostatních kináz jsou hodnoty  $IC_{50}$  větší než 10  $\mu$ M (Gray a kol., 1998; Gray a kol., 1999).

Aminopurvalanol (aminopurvalanol A, NG97) je účinným inhibitorem vůči komplexům CDK1/cyklin B, CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E a CDK5/p35,  $IC_{50}$  zde nabývá hodnot 33, 33, 28 a 20 nM. Inhibiční efekt byl také zaznamenán u kináz ERK1 a ERK2 v mikromolárních koncentracích. V případě ostatních kináz jsou hodnoty  $IC_{50}$  větší než 100  $\mu$ M (Chang a kol., 1999). Vlivem aminopurvalanolu dochází k blokaci buněčného cyklu v bodě G2/M a indukci apoptotických procesů (Chang a kol., 1999; Knockaert a kol., 2000; Le Breton a kol., 2003; Bernabò a kol., 2017).

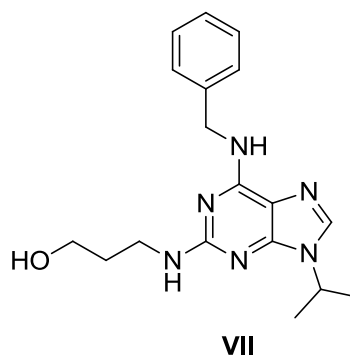
Dalším významným purinovým analogem je 6-[(2-hydroxybenzyl)amino]-2-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurin neboli olomoucín II (VI) (Obr. 11).

Olomoucine II vykazuje desetkrát vyšší inhibiční aktivitu než roskovitin. V rámci cytotoxických vlastností má lepší výsledky než purvalanol A (Kryštof a kol., 2002). Přestože byl původně navržen jako specifický inhibitor vůči CDK1/cyklin B, jeho inhibiční potenciál se projevil také v případě kinázy CDK2 a transkripčních CDK7 a CDK9. Od roskovitinu se olomoucine II liší pouze přítomností hydroxylové skupiny v pozici *ortho* na benzylovém kruhu. Tato drobná modifikace vede k desetinásobnému zvýšení inhibiční aktivity vůči kináze CDK9. Olomoucine II způsobuje transkripční aktivaci a akumulaci tumor-supresorového proteinu p53 v buněčném jádře při dvojnásobně až trojnásobně nižší koncentraci než roskovitin (Kryštof a kol., 2005). Dále také jak olomoucine II, tak roskovitin inhibují syntézu RNA zablokováním karboxy-koncové domény molekuly RNA-polymerázy II (Ljungman a Paulsen, 2001; Diwan a kol., 2004).



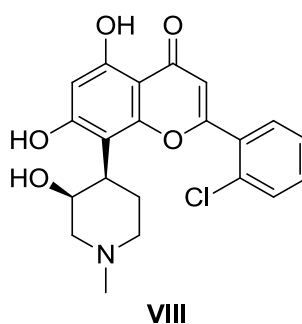
Obr. 11: Struktura CDK inhibitoru olomoucine II.

Za zmínku také stojí purinový analog 2-[3-hydroxypropylamino]-6-benzylamino-9-isopropylpurin pojmenován jako bohemin (**VII**) (Obr. 12), který je dva až třikrát efektivnějším inhibitorem v porovnání s olomoucinem. Bohemin způsobuje přibližně 50% inhibici buněčné proliferace i viability při nižších koncentracích než olomoucine (Maďarová a kol., 2002). V *in vitro* podmínkách bohemin inhibuje kinázy CDK1 rodiny – CDK1, CDK2, CDK3 a CDK5, žádný efekt nebyl detekován v případě kináz CDK4, CDK6, MAPK, PKC (proteinkináza C) a PAK (*p21 activated protein* kináza), (Havlíček a kol., 1997; Meijer a kol., 1997; Maďarová a kol., 2002). V rámci testování účinku boheminu u hybridomových buněk byla inhibice buněčného růstu detekována při 10 $\mu$ M až 30 $\mu$ M koncentraci. V závislosti na koncentraci má bohemin vliv na G1/S a G2/M fázi. Při 3 $\mu$ M koncentraci boheminu se cyklus většiny buněk pozastaví v bodě G2/M, zatímco při 30 $\mu$ M koncentracích ve fázi G0/G1 (Franěk a kol., 2001).



Obr. 12: Struktura CDK inhibitoru boheminu.

Další velkou skupinou látek s inhibičním potenciálem vůči CDK tvoří flavonoidy. První identifikovanou látkou a zároveň nejvýznamnějším představitelem je 2-(2-chlorfenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(3*S*,4*R*)-3-hydroxy-1-methyl-4-piperidiny]-4-chromenon (Obr. 13) známý jako flavopiridol (**VIII**) (L-868275, HMR 1275, alvocidib), který byl prvním CDK inhibitorem testovaným v rámci klinické fáze. Jedná se o semi-syntetický alkaloid rostlinného původu s významným inhibičním účinkem vůči kinázám CDK1, CDK2, CDK 3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 a CDK9 (Naik a kol., 1988; Senderowicz, 1999; Senderowicz a Sausville, 2000). V *in vitro* podmínkách potlačuje růst nádorových buněk blokací bodu G1/S a G2/M (Losiewicz a kol., 1994; Carlson a kol., 1996). Prokázán byl také jeho účinek na úrovni transkripce prostřednictvím inhibice kinázy CDK9 a potlačením funkce RNA polymerázy II (Shapiro, 2006). V rámci preklinických studií bylo zjištěno, že vlivem flavopiridolu dochází k inhibici procesů spojených s angiogenezí, potlačením transkripce prostřednictvím blokace transkripčního elongačního faktoru B (PTEF-b) nebo k inhibici antiapoptotických proteinů (Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub> apod.), (Rapella a kol., 2002; Chao a kol., 2000; Kitada a kol., 2000; Gojo a kol., 2002). Dále se podařilo prokázat represi proteinu p21<sup>CIP1</sup>, vazbu na duplexní DNA, inhibici fosforylace survivinu, negativní regulaci cyklinu D1 a inhibici signální dráhy spojenou s kinázou IKK (IκB kináza) a proteinem NF-κB (*nuclear factor κB*), (Rosato a kol., 2004; Bible a kol., 2000; Wall a kol., 2003; Carlson a kol., 1999; Takada a Aggarwal, 2004). V poslední době se daří identifikovat další komponenty buněčné signalizace a molekulárních procesů, které jsou ovlivňovány působením flavopiridolu – například aktivita TGF-β (transformující růstový faktor β), translace a biogeneze ribosomálních proteinů nebo aktivace kaspáz 3, 7 a 9 (Rostam a kol., 2018; Erol a kol., 2017; Gokce a kol., 2016).



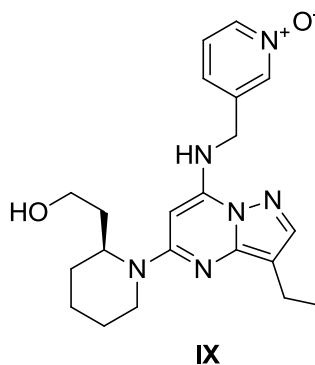
Obr. 13: Struktura CDK inhibitoru flavopiridolu (*alvocidib*, HMR 1275, L-868275).

Během prvních testů klinické fáze byla detekována inhibiční aktivita flavopiridolu u non-Hodgkinova lymfomu, karcinomu ledvin, prostaty, tlustého střeva a žaludku. Nežádoucími vedlejšími efekty byly průjem a inflamatorní syndrom (*pro-inflammatory syndrome*) spojený s hypotenzí (Senderowicz, 1999). Flavopiridol byl později také testován v rámci druhé klinické fáze – a to jak v rámci monoterapie, tak v kombinaci s různými cytostatiky (Kouroukis a kol., 2003). Nejlepších výsledků se podařilo dosáhnout v rámci terapie chronické myeloidní leukémie a metastatické rakoviny slinivky břišní (Karp a kol., 2011; Lin a kol., 2009). I přes značnou účinnost v klinických testech je efekt flavopiridolu asociován s výraznými nežádoucími účinky, nejvýznamnější je problematika TLS (syndrom nádorového rozpadu), (Phelps a kol., 2009; Lin a kol., 2009).

Významným CDK inhibitorem je dále 1-[3-ethyl-7-[(1-oxido-3-pyridinyl)methyl]amino]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5-yl]-2*S*-piperidinethanol (Obr. 14) známý pod označením dinaciclib (**IX**) (SCH 727965, MK-7965). U dinaciclibu byla prokázána inhibiční aktivita proti kinázám CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 - v *in vitro* podmínkách nabývalo  $IC_{50}$  hodnot 3, 1, 1 a 4 nM (Parry a kol., 2010). V porovnání s flavopiridolem vykazuje dinaciclib obdobný inhibiční potenciál vůči kinázám CDK1 a CDK9, ale u CDK2 a CDK5 je dvanáct až čtrnáctkrát účinnější (Feldmann a kol., 2011; Parry a kol., 2010). Dinaciclib způsobuje zastavení buněčného cyklu v bodě G2/M, potlačení exprese proteinů Mcl-1, Bcl- $X_L$  a survivinu, aktivuje kaspázu 3 a indukuje apoptotické procesy (Lin a kol., 2017). Bylo také prokázáno, že dinaciclib způsobuje inhibici syntézy DNA zablokováním vložení thyminu v rakovinných buňkách vaječníku s hodnotou  $IC_{50} = 4$  nM. Při koncentraci 5 mg/kg dochází k potlačení nádorového růstu o 50 % u myšího xenografního modelu karcinomu vaječníku. V rámci *in vitro* testů se dinaciclib projevil také jako účinný inhibitor vůči širokému spektru lidských nádorových linií o hodnotách  $IC_{50} = 7 - 17$  nM (Paruch a kol., 2010).



U xenografního modelu lidských nádorových buněk pankreatu dochází po podání dinaciclibu o koncentraci 40 mg/kg dvakrát týdně po dobu čtyř týdnů k redukci nádorového růstu o 100 % (Feldmann a kol., 2011).

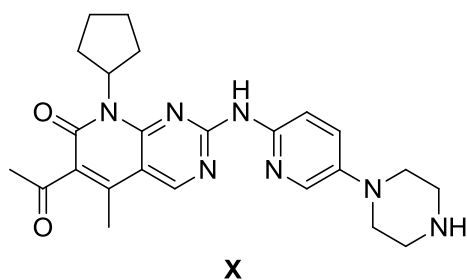


Obr. 14: Struktura CDK inhibitoru dinaciclibu (SCH 727965, MK-7965).

V rámci první klinické fáze byl dinaciclib náhodně testován u různých variant rakovinných onemocnění. Jedna z prvních studií se týkala pacientů s pokročilými malignitami, kdy se terapie zúčastnilo 48 jedinců s různými typy nádorů. U 10 jedinců bylo dosaženo stabilizace průběhu onemocnění během minimálně 4 terapeutických cyklů. Nejčastějšími vedlejšími efekty byly anémie, nauzea, únava a nechutenství (Nemunaitis a kol., 2013). Během fáze II byl dinaciclib testován v rámci relapsivní a refrakterní formy akutní myeloidní leukémie a akutní lymfoidní leukémie u 20 pacientů. U většiny pacientů bylo detekováno rapidní, ale pouze dočasné snížení cirkulujících nádorových buněk. Toxicita se projevila v rámci gastrointestinálního traktu, dalšími vedlejšími účinky bylo nechutenství, zvýšená transaminace a projevy TLS, které v případě dvou pacientů vedly k úmrtí v důsledku selhání ledvin (Gojo a kol., 2013). V rámci druhé klinické fáze byl také dinaciclib testován u pacientů trpících nemalobuněčným karcinomem plic, kde se však při jeho samostatném podávání neprojevil žádný pozitivní účinek. Nežádoucí efekty zahrnovaly zvracení, průjem, leukopenii a neutropenii (Stephenson a kol., 2014). Dále byl dinaciclib testován u pacientů s pokročilou rakovinou prsu. Protinádorová aktivita byla zaznamenána u dvou ze sedmi pacientů s ER-positivní (estrogenní receptor) a HER2-negativní (receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2) metastatickou formou rakoviny prsu. Účinnost dinaciclibu ovšem nebyla tak vysoká jako u kontrolního léčiva capecitabinu (Mita a kol., 2014).

Během randomizovaných studií se obecně dinaciclíb ukázal jako nejúčinnější u chronické lymfocytární leukémie (Flynn a kol., 2010; Flynn a kol., 2015; Nemunaitis a kol., 2013). V rámci následných cílených studií byl pak dinaciclíb u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií testován zároveň s rituximabem. U 4 z 5 jedinců byla nemoc stabilizována a v případě jednoho jedince došlo k celkovému zlepšení zdravotního stavu. Vedlejšími účinky zahrnovaly hematologické, digestivní a metabolické změny. Žádné interakce mezi oběma podanými léčivými nebyly identifikovány (Fabre a kol., 2014). Jako samostatné terapeutikum se dinaciclíb osvědčil u mnohočetného myelomu jak v případě první tak druhé klinické fáze. Celkové zlepšení bylo zjištěno u 11 % pacientů. Leukopenie, trombocytopenie, gastrointestinální problémy, nechutenství a alopecie byly nejčastějšími vedlejšími efekty (Kumar a kol., 2015). Účinnost a tolerabilita dinaciclíbu byla také testována v třetí klinické fázi, a to v porovnání s léčivem typu monoklonální protilátky ofatumumabem u pacientů trpících chronickou lymfocytární leukémií (relapsivní a refraktorní formy). Dinaciclíb byl podáván v postupně se zvyšujících dávkách během prvního dvacetiosmidenního cyklu, od druhého až do posledního dvanáctého cyklu byla udržována konstantní dávka. Během terapie dinaciclíb vykazoval přijatelné cytotoxické vlastnosti a vyšší protinádorovou aktivitu oproti ofatumumabu. V obou případech došlo k částečnému zlepšení zdravotního stavu pacientů. Hodnota ORR (*overall response rate*) odrážející celkovou účinnost terapie byla v případě dinaciclíbu 40 % a u ofatumumabu 8,3 %. Nejčastějšími nežádoucími účinky byly neutropenie, trombocytopenie, pneumonie a sepse (Ghia a kol., 2017).

Další látkou s významnými klinickými výsledky je 6-acetyl-8-cyklopentyl-5-methyl-2-[[5-(1-piperazinyl)-2-pyridinyl]amino]-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-on, který nese označení palbociclíb (**X**) (IBRANCE, PD 0332991) (Obr. 15). Jedná se o významný selektivní inhibitor vůči kinázám, které tvoří komplex s cyklinem D, tedy CDK4 a CDK6. V případě CDK4 má IC<sub>50</sub> hodnotu 11 nM a u CDK6 16 nM, inhibiční aktivita vůči ostatním kinázám nebyla prokázána. Palbociclíb inhibuje fosforylační aktivaci proteinu Rb a způsobuje zastavení buněčného cyklu v bodě G1 při nanomolárních koncentracích (Fry a kol., 2004).

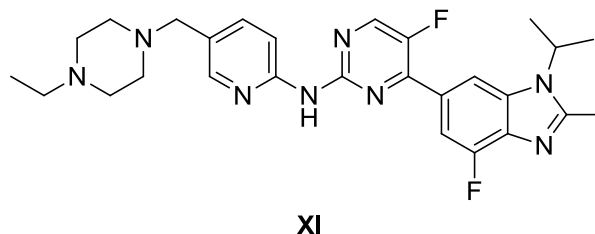


Obr. 15: Struktura CDK inhibitoru palbociclibu (PD 0332991).

Během preklinických studií bylo zjištěno, že palbociclib má významný inhibiční účinek vůči ER-pozitivním rakovinným buňkám prsní tkáně, působí synergicky s antiestrogeny a zabraňuje endokrinní rezistenci (Finn a kol., 2009). Na základě tohoto zjištění byl palbociclib testován spolu s léčivem letrozolem (inhibitorem enzymu aromatázy) v rámci první a druhé klinické fáze u postmenopauzálních žen s ER-pozitivní a HER2-negativní pokročilou rakovinou prsu. Účinek letrozolu spolu s palbociclibem byl významně vyšší oproti samotnému letrozolu (Beaver a kol., 2015). Jako účinné terapeutikum v rámci rakoviny prsu se palbociclib v kombinaci s letrozolem projevil také v třetí klinické fázi, přestože byly u terapie palbociclibem zaznamenány myelotoxické účinky oproti kontrole (Finn a kol., 2016). Třetí klinická fáze se také týkala studie účinku palbociclibu s léčivem fulvestrantem u metastatické ER-pozitivní a HER2-negativní rakoviny prsu asijské populace. Oproti samotnému fulvestrantu měla terapie v kombinaci s palbociclibem znatelně lepší výsledky. Nejčastějšími vedlejšími účinky zde byly leukopenie a neutropenie, obecně se ale u palbociclibu neprojevil výrazné cytotoxické efekty (Iwata a kol., 2017).

*N*-[5-[(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl]pyridin-2-yl]-5-fluoro-4-(7-fluoro-2-methyl-3-propan-2-ylbenzimidazol-5-yl)pyrimidin-2-amin (Obr. 16) pojmenován jako abemaciclib (**XI**) (LY2835219) je dalším významným inhibitorem kináz CDK4 a CDK6, jejichž aktivitu potlačuje již při nanomolárních koncentracích (2 nM a 10 nM). Dále byl slabší inhibiční efekt zjištěn u kinázy CDK9, kdy byla hodnota IC<sub>50</sub> pětikrát vyšší. Vůči ostatním kinázám se neprojevil žádný významný účinek (Gelbert a kol., 2014). Stejně jako u výše pospaných inhibitorů je účinek abemaciclibu založen na kompetici s ATP-vazebnou doménou konkrétních kináz. Čtrnáctkrát vyšší efektivitu vykazuje vůči CDK4 oproti CDK6 (Lallena a kol., 2015). Abemaciclib dále potlačuje fosforylaci proteinu Rb během časně G1 fáze, a tím blokuje přechod z fáze G1 do následné fáze S. Inhibičně působí také na syntézu DNA (Gelbert a kol., 2014). V porovnání s dvěma dalšími významnými inhibitory CDK4 a CDK6 palbociclibem

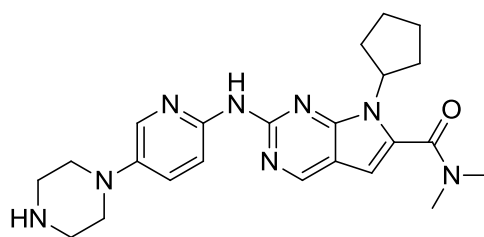
a ribociclibem (viz dále), vykazuje abemaciclib nejvyšší selektivitu pro CDK4 v komplexu s cyklinem D1 s hodnotami  $IC_{50}$  pětkrát nižšími než u zbylých dvou inhibitorů (Corona a Generali, 2018).



Obr. 16: Struktura CDK inhibitoru abemaciclibu (LY2835219).

V rámci první klinické fáze se projevily slibné farmakokinetické i cytotoxické vlastnosti abemaciclibu v kombinaci s fulvestrantem u pacientů trpících HR-pozitivní (hormon receptor) metastatickou rakovinou prsu. Častými nežádoucími efekty byly nechutenství, průjem, neutropenie a nauzea (Patnaik a kol., 2014; Tolaney a kol., 2015). Následně byla protinádorová aktivita abemaciclibu testována ve druhé klinické fázi u HR-pozitivní a HER2-negativní metastatické rakoviny prsu. Zlepšení zdravotního stavu bylo zaznamenáno u 26 % pacientů. Nejčastějším nežádoucím efektem byl průjem, dále se pak objevovaly další projevy popsané v předchozí klinické fázi (Dickler a kol., 2017). V třetí klinické fázi byl sledován účinek abemaciclibu v kombinaci s fulvestrantem oproti samotnému fulvestrantu opět u pacientů s HR-pozitivní a HER2-negativní metastatickou rakovinou prsu. Při dávkování 150 mg abemaciclibu spolu s fulvestrantem dvakrát denně došlo k výraznému zlepšení u 48,1 % jedinců a potvrzení výrazných cytotoxických vlastností, a to i přes již dříve pozorované nežádoucí efekty (Sledge a kol., 2017).

Třetím významným inhibitorem kináz CDK4 a CDK6 je již dříve zmíněný ribociclib (**XII**), neboli 7-cyklopentyl-*N,N*-dimethyl-2-[(5-piperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-6-karboxamid (KISQALI, LEE011) (Obr. 17). Inhibicí proteinu Rb způsobuje také zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 a má negativní vliv na syntézu DNA (Rader a kol., 2013). V prvních *in vivo* testech se protinádorový účinek ribociclibu projevilo v případě ER-pozitivní rakoviny prsu, liposarkomu, neuroblastomu, melanomu a maligního nádoru ledvin, a to při studiích jak účinku samotného ribociclibu, tak v kombinaci s dalšími látkami (O'Brien a kol., 2014; Zhan a kol., 2014; Rader a kol., 2013; Kim a kol., 2014).



XII

Obr. 17: Struktura CDK inhibitoru ribociclibu (KISQALI, LEE011).

V první klinické fázi byl ribociclib testován samostatně nebo společně s jinými léčivy, a to v rámci různých variant rakovinných onemocnění (Infante a kol., 2016; Wood a kol., 2017; Hart a kol., 2017). Druhá fáze klinických testů zahrnuje mimo jiné také významnou studii ribociclibu u metastatické HR-pozitivní a HER2-negativní rakoviny prsu (Finn a kol., 2015; Infante a kol., 2016; Georger a kol., 2017). U rané i pokročilé a metastatické HR-pozitivní a HER2-negativní rakoviny prsu byl ribociclib testován také v třetí klinické fázi. Jednotlivé studie zahrnovaly ribociclib v kombinaci s letrozolem, fulvestrantem, tamoxifenem, NSAI (*non-steroidal aromatase inhibitor*) a goserelinem. Obecně se ribociclib projevil i přes některé vedlejší účinky jako slibné terapeutikum s výraznými cytotoxickými vlastnostmi (Sonke a kol., 2017; López-Tarruella a kol., 2017; Shah a kol., 2018).

Přehled výše popsáných CDK inhibitorů je uveden v Tab. 3. Důležité je ovšem zdůraznit, že kromě významných CDK inhibitorů popsáných v rámci této kapitoly již existuje a jsou stále navrhovány další látky různého charakteru s významnou inhibiční aktivitou vůči CDK.

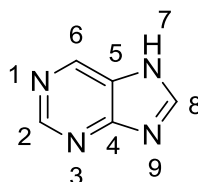
Za zmínku určitě stojí série substituovaných 6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů publikovaných v roce 2013, které představují jedny z nejúčinnějších CDK inhibitorů vůbec. Jako nejúčinnější látka se projevil 9-cyklopentyl-9H-purinový derivát substituovaný v pozici C2 1,4-diaminocyklohexanem a v pozici C6 2-(5-(aminomethyl)pyridin-2-yl)fenolem, který je významným inhibitorem CDK1 a CDK2 o  $IC_{50}$  (CDK1) = 46,7 nM a  $IC_{50}$  (CDK2) = 7,1 nM. Jeho antiproliferační aktivita byla testována *in vitro* u více variant buněčných linií, hodnoty  $IC_{50}$  se zde pohybovaly v rozmezí 0,016 - 0,035  $\mu$ M (Gucký a kol., 2013).

Tab. 3: Přehled významných CDK inhibitorů.

inhibitor	typ	mechanismus účinku	významně inhibované CDK
olomoucín	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 5
roskovitín	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9
purvalanol A	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 4, 5
purvalanol B	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 5
aminopurvalanol	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 5
olomoucín II	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 7, 9
bohemín	trisubstituovaný purin	ATP-kompetitivní	1, 2, 3, 5
flavopiridol	flavonoid	ATP-kompetitivní	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9
dinaciclíb	pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidin	ATP-kompetitivní	1, 2, 5, 9
palbociclíb	pyrido[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin	ATP-kompetitivní	4, 6
abemaciclíb	pyrimidin-benzo[ <i>d</i> ]imidazol	ATP-kompetitivní	4, 6
ribociclíb	pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidin	ATP-kompetitivní	4, 6

## 2.2 Purinové bioisostery

Purin (**XIII**) představuje dusíkatou heterocyklickou sloučeninu skládající se z pyrimidinového a imidazolového cyklu (Obr. 18). Dvě báze nacházející se v nukleových kyselinách jsou puriny: *9H*-purin-6-amin (adenin) a 2-amino-1*H*-purin-6(*9H*)-on (guanin). Ty se dále nacházejí v molekulách adenosintrifosfátu (ATP), adenosindifosfátu (ADP), adenosinmonofosfátu (AMP), cyklického adenosintrifosfátu (cAMP), guanosintrifosfátu (GTP) nebo cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Puriny jsou také součástí molekuly nikotinamidadenindinukleotidu (NAD), nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP) a koenzymu Q (Cook a kol., 1978). Purinová struktura je obsažena také například v močové kyselině, hlavnímu metabolickému produktu savců, a kofeinu (Choi a Curhan, 2007; Maiuolo a kol., 2016).



**XIII**

*Obr. 18: Purinový heterocyklus s číslováním jednotlivých atomů.*

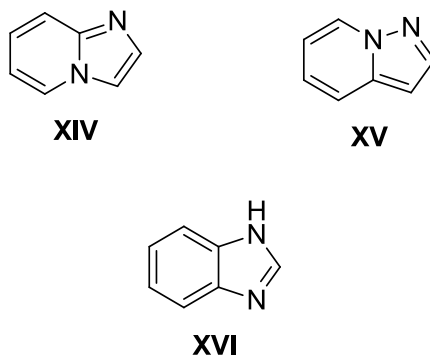
Z předešlé kapitoly vyplývá, že látky odvozené od purinového skeletu jsou významnou skupinou CDK inhibitorů. Tato skutečnost vedla k návrhu dalších strukturálních variací původního heterocyklu, které označujeme jako bioisostery (Patani a LaVoie, 1996). Purinové bioisostery můžeme rozdělit na základě počtu dusíkových atomů, které obsahují (viz Tab. 4).

*Tab. 4: Přehled významných purinových bioisosterů (Jorda a kol., 2012).*

<b>počet dusíkových atomů v heterocyklu</b>	<b>název</b>
2	imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyridiny
	pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyridiny
	benzo[ <i>d</i> ]imidazoly
3	imidazo[4,5- <i>d</i> ]pyridiny
	imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyraziny
	pyrrolo[3,2- <i>d</i> ]pyrimidiny
	pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidiny
4	triazolo[1,5- <i>a</i> ]pyrimidiny
	pyrazolo[3,4- <i>d</i> ]pyrimidiny
	pyrazolo[4,3- <i>d</i> ]pyrimidiny
	imidazo[2,1- <i>f</i> ]-1,2,4-triaziny
	pyrazolo[1,5- <i>a</i> ]-1,3,5-triaziny
5	1,2,3-triazolo[4,5- <i>d</i> ]pyrimidiny

První skupinu tvoří bioisostery obsahující v heterocyklu dva atomy dusíku. Přestože zde existuje celkem osm možných variant uspořádání, syntetizovány a popsány ve vztahu k CDK byly doposud imidazo[1,2-*a*]pyridiny, pyrazolo[1,5-*a*]pyridiny a benzo[*d*]imidazoly (Ramya a kol., 2018; Umei a kol., 2017; Johannes a kol., 2018). Imidazo[1,2-*a*]pyridinový cyklus (**XIV**) je například základem testovaného inhibitoru AZ703, který má inhibiční účinek vůči CDK1 a CDK2 o  $IC_{50}$  29 a 34 nM, dále inhibuje CDK4 o  $IC_{50}$  10  $\mu$ M a CDK7 a CDK9 o hodnotách  $IC_{50}$  2,1 a 5,2  $\mu$ M (Cai a kol., 2006). Imidazo[1,2-*a*]pyridiny a ani látky odvozené od pyrazolo[1,5-*a*]pyridinu (**XV**) nemají ovšem inhibiční aktivitu tak velkou jako imidazo[1,2-*a*]pyraziny nebo pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny, přestože se ukázalo, že se k molekule kinázy CDK2 vážou stejným způsobem (Fischmann a kol., 2008).

Deriváty benzo[*d*]imidazolového cyklu (**XVI**) byly navrženy a testovány jako inhibitory kinázy CDK5, jejich účinnost byla ale zdatelně nižší v porovnání s roskovitinem (Jain a kol., 2011). Struktura imidazo[1,2-*a*]pyridinového, pyrazolo[1,5-*a*]pyridinového a benzo[*d*]imidazolového heterocyklu je uvedena na Obr. 19.



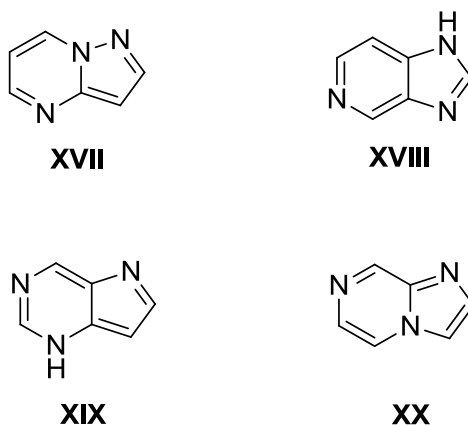
Obr. 19: Základní struktury dvou-dusíkatých purinových bioisosterů.

Mezi biosistery obsahující tři dusíkaté atomy patří imidazo[4,5-*d*]pyridiny, imidazo[1,2-*a*]pyraziny, pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidiny a pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny. Deriváty pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinu (**XVII**) vykazují inhibiční aktivitu vůči kinázám CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9 o hodnotách  $IC_{50}$  3, 30, 30, 250 a 90 nM. Negativně regulují expresi cyklinů A, E a D1, inhibují fosforylaci proteinu Rb a blokuji karboxylovou doménu RNA polymerázy II. Buněčný cyklus zastavují ve fázi S a G2/M (Heathcote a kol., 2010). Doposud nejvýznamnějším CDK inhibitorem s pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinovým cyklem, který byl zapojen do klinických testů, je



již výše popsaný dinaciclíb (SCH 727965, MK-7965) s výraznou inhibiční aktivitou vůči kinázám CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 (Parry a kol., 2010).

Látky odvozené od imidazo[4,5-*d*]pyridinového cyklu (**XVIII**) vykazují obdobnou aktivitu i selektivitu jako analogy základního purinového heterocyklu (WO 2009034411) Pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidiny (respektive 9-deazapuriny) (**XIX**) substituované v pozici C6 vykazují antiproliferační aktivitu proti různým typům rakovinných buněk v mikromolárních koncentracích. Ve většině případů dochází k blokaci buněčného cyklu v bodě G2/M (Temburnikar a kol., 2015; Tian a kol., 2017). Deriváty imidazo[1,2-*a*]pyrazinu (**XX**) vykazují antiproliferační aktivitu proti buňkám melanomu v mikromolárních až submikromolárních koncentracích (Garamvölgyi a kol., 2016). Dále se jejich inhibiční potenciál projevil u buněk nemalobuněčného karcinomu plic (Bazin a kol., 2016). Obecně ovšem jejich inhibiční aktivita není větší než u klasických purinových analogů (Fischmann a kol., 2008). Struktury zmíněných tří-dusíkatých purinových bioisosterů jsou uvedeny na Obr. 20.



Obr. 20: Základní struktury tří-dusíkatých purinových bioisosterů.

Skupina purinových bioisosterů se čtyřmi atomy dusíku zahrnuje triazolo[1,5-*a*]pyrimidiny, pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny, pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny, imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triaziny a pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny. Imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triaziny (**XXI**) mají atom dusíku nacházející se původně v pozici 9 na purinovém heterocyklu umístěný do pozice 4. Bioisoster roskovitinu GP0212 (N-&N2) s imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triazinovým cyklem má s původním roskovitinem téměř srovnatelné průměrné hodnoty IC<sub>50</sub> (25 μM oproti 28,3 μM), celkově však nejeví větší inhibiční potenciál než roskovitin (Bettayeb a kol., 2008).

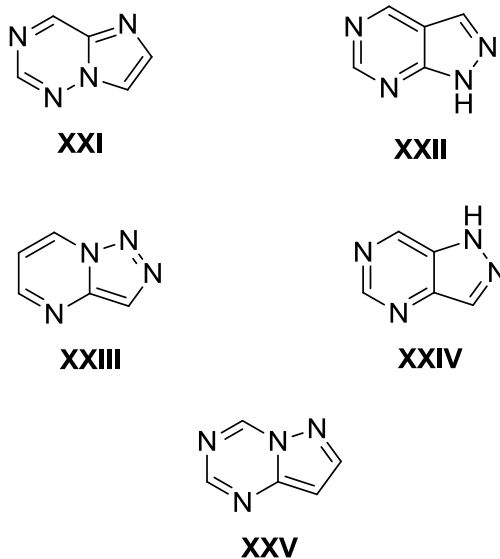
Deriváty pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinového cyklu (**XXII**) byly odvozeny od původního purinového inhibitoru olomoucínu, neprojevily ale žádnou významnou CDK inhibiční aktivitu, a to pravděpodobně v důsledku ztráty dusíkového atomu ze 7. pozice, která má zásadní roli při vazbě inhibitoru do aktivního místa molekuly kinázy (Kim a kol., 2003).

Triazolo[1,5-*a*]pyrimidiny (**XXIII**) jsou látky s významnou inhibiční aktivitou vůči kináze CDK2. Oproti pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinům mají v 9. pozici (purinového číslování) přítomný další atom dusíků, který zřejmě zvyšuje celkovou účinnost molekuly inhibitoru (Richardson a kol., 2006).

Deriváty pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinového heterocyklu (**XXIV**) byly prvně syntetizovány jako inhibitory kinázy CDK1 se substituenty ve dvou pozicích (Moravcová a kol., 2003). Vzhledem k tomu, že oproti původním purinovým derivátům vykazovaly větší účinnost, byly následně navrženy a připraveny další deriváty již se třemi substituenty (WO 2003082872). Antiproliferační a selektivní vlastnosti pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových analogů odvozených od roskovitinu jsou v porovnání s roskovitinem celkově slibnější a k molekule kinázy CDK2 se váží zřejmě obdobně (Jorda a kol., 2011). Roskovitinový derivát s označením LGR1406 byl testován u nádorových buněk hladké svaloviny cév (VSMC). Oproti roskovitinu má v tomto případě znatelně větší antiproliferační aktivitu s více než pětinasobně nižší hodnotou IC<sub>50</sub>. LGR1406 u nádorových buněk VSMC způsobuje zastavení buněčného cyklu ve fázi G1 (Sroka a kol., 2010). Připraveny a popsány byly také pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinové analogy myoseverinu. Látka E2GG má inhibiční aktivitu vůči polymerizaci tubulinu a aktivitě CDK1, CDK2 a CDK7 (Kryštof a kol., 2006). Některé novější trisubstituované deriváty pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu významně potlačují aktivitu kináz CDK2 a CDK5 a buněnou proliferaci. Prokázána byla také negativní regulace cyklinů A a B, defosforylace histonu H7 a indukce apoptózy vnitřní (mitochondriální) cestou u HCT-116 nádorových buněk tlustého střeva (Řezníčková a kol., 2015). Nové pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinové deriváty byly také testovány v rámci *in vitro* i *in vivo* experimentů u hepatocelulárního karcinomu. Derivát LGR2674 v *in vivo* testech významně potlačil množství cév v nádoru, buněčnou proliferaci a celkový růst nádoru (Zhang a kol., 2016). Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinové deriváty substituované hydroxyalkylaminy v pozici C5 inhibují aktivitu CDK2 a CDK5 v nanomolárních koncentracích, způsobují zástavu buněčného cyklu ve fázi S a G2/M

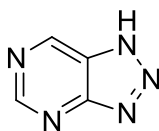
a indukují apoptózu u různých typů nádorových buněčných linií (Vymětalová a kol., 2016).

Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny (XXV) mají oproti základnímu purinovému heterocyklu atom dusíku z pozice 9 přesunut do pozice 5 (Bettayeb a kol., 2008). Bude jim věnována pozornost v dalších částech této diplomové práce. Struktury všech uvedených čtyř-dusíkatých bioisosterů jsou uvedeny na Obr. 21.



Obr. 21: Základní struktury čtyř-dusíkatých purinových bioisosterů.

Poslední skupinu purinových bioisosterů představují látky s pěti dusíkovými atomy. Zde je třeba uvést ve vztahu k CDK především 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidiny (XXVI), respektive 8-azapuriny, které na rozdíl od purinů obsahují další atom dusíku v 8. pozici. 2,6,9-trisubstituované 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidinové deriváty vykazují antiproliferační potenciál a schopnost aktivace tumor-supresorového proteinu p53, obecně ale mají oproti modelovým purinovým inhibitorům nižší inhibiční aktivitu vůči CDK2, a to pravděpodobně v důsledku přítomnosti dalšího dusíkového atomu (Havlíček a kol., 2005). V *in vitro* testech byl významnější antiproliferační efekt 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidinů prokázán u buněčných linií melanomu, nemalobuněčné rakoviny plic a leukémie (Elkamhawy a kol., 2015). Dále se jejich protinádorové vlastnosti potvrdily u lidských rakovinných buněk prsu a jater (Wang a kol., 2015). Základní struktura 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pyrimidinového cyklu je uvedena na Obr. 22.

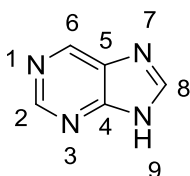


**XXVI**

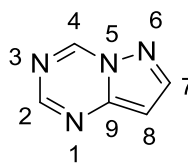
Obr. 22: Základní struktura pěti-dusíkatého 1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidinového heterocyklu.

### 2.3 Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny

Jak již bylo uvedeno v předcházející kapitole, pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny (neboli 5-aza-9-deazapuriny) (XXV) představují čtyř-dusíkaté bioisostery purinového heterocyklu, u kterých se dusíkový atom nachází v pozicích 1, 3, 5 a 6 (Raboisson a kol., 2008; Bettayeb a kol., 2008). Jejich základní strukturu a rozdíl v číslování oproti klasickému purinovému heterocyklu (XIII) lze vidět na Obr. 23.



**XIII**



**XXV**

Obr. 23: Porovnání základního purinového a pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu s vyznačeným číslováním jednotlivých atomů.

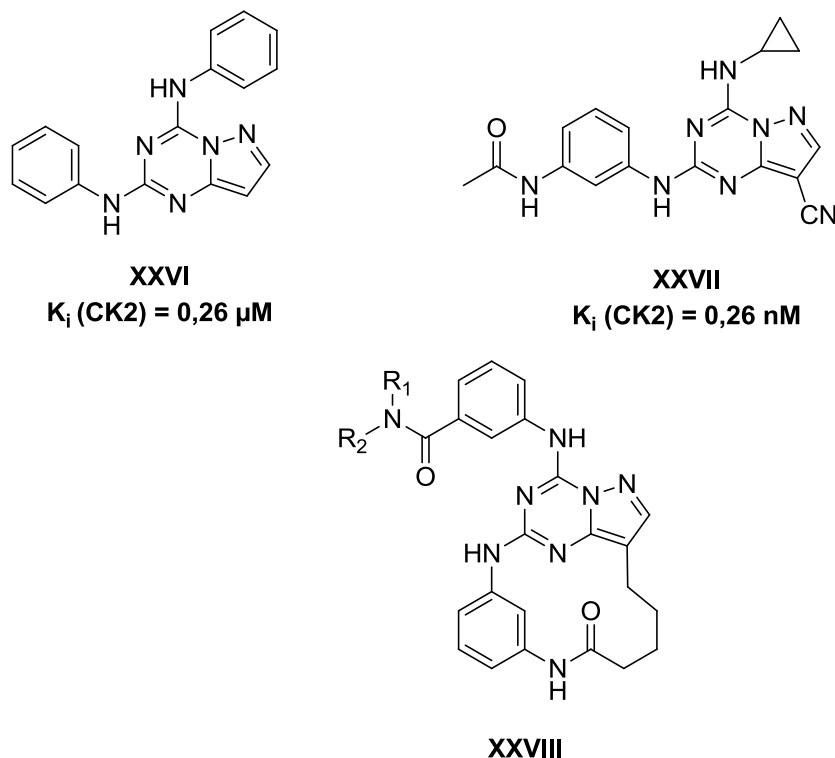
Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny mají obecně stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako puriny, s tím rozdílem, že jsou stabilnější v *in vivo* podmínkách. Nedochází zde k žádnému působení nukleosidáz v pozici C8 jako u purinového cyklu (Raboisson a kol., 2002a; Raboisson a kol., 2008). Doposud publikované informace týkající se biologické aktivity pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů jsou předmětem následující podkapitoly.

#### 2.3.1 Biologická aktivita

Látky odvozené od pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu vykazují v živých organismech různorodé vlastnosti zahrnující významnou inhibiční aktivitu vůči některým enzymům nebo vazbu na určité typy receptorů (Nie a kol., 2008; Bettayeb a kol., 2008; Raboisson a kol., 2002a).

### 2.3.1.1 Inhibitory enzymů

U pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů se podařilo prokázat inhibiční aktivitu vůči enzymu kasein kináze II (CK2), (Nie a kol., 2007; Nie a kol., 2008). Patří zde několik substituovaných 2,4-diaminopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů, u kterých byla při testech na rakovinných buněčných liniích prostaty a tlustého střeva prokázána cytotoxická aktivita. Hodnota  $K_i$  základního derivátu  $N^2,N^4$ -difenylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-diaminu (**XXVI**) byla 0,26  $\mu\text{M}$ . Další odvozené látky měly hodnoty  $K_i$  řádově nižší. Hodnota  $K_i$  u nejvýznamnějšího derivátu  $N$ -(3-((8-kyano-4-(cyklopropylamino)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2-yl)amino)fenyl)acetamidu (**XXVII**) byla 0,26 nM (Nie a kol., 2007). Oba zmíněné deriváty **XXVI** a **XXVII** jsou uvedeny na Obr. 24. Navrženo a připraveno bylo také několik makrocyclických pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových sloučenin s inhibiční aktivitou vůči CK2 s hodnotami  $K_i$  okolo 1,0 nM, hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly obecně menší než 100 nM (Nie a kol., 2008). Obecná základní struktura připravených makrocyclických derivátů (**XXVIII**) je uvedena na Obr. 24.

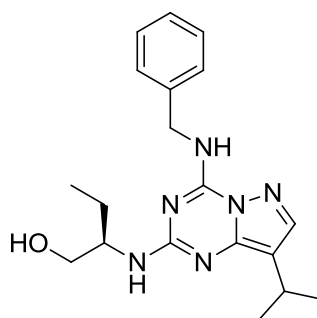


Obr. 24: Struktury pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů s inhibiční aktivitou vůči CK2.

Látky odvozené od pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu jsou významnými inhibitory CDK (Bettayeb a kol., 2008; Popowycz a kol., 2009). Doposud

se již podařilo připravit velké množství derivátů pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu a mnohé z nich vykazovaly významnou inhibiční aktivitu zejména vůči kináze CDK2 (WO 2005082908 A1; WO 2005077954 A3; WO 2010103486 A1).

Důležitým zástupcem pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových inhibitorů je bioisoster roskovitinu N-&-N1 (respektive GP0210) se systematickým názvem 2-((4-(benzylamino)-8-isopropylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2-yl)amino)butan-1-ol (**XXIX**), který je uveden na Obr. 25. Přestože přesun dusíkového atomu z původní pozice 9 do pozice 5 způsobuje pouze mírnou modifikaci elektrostatického potenciálu molekuly, v rámci biologických interakcí hraje tato změna důležitou roli. V porovnání s roskovitinem derivát **XXIX** obecně vykazuje dvou až trojnásobně vyšší účinnost vůči testovaným enzymatickým komplexům CDK1/cyklin B, CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E, CDK5/p25, CDK7/cyklin H, CDK9/cyklin T, dále také vůči enzymům CK1δ/ε, Dyrk1A, Erk2 a GSK-3α/β (Bettayeb a kol., 2008). Jednotlivé hodnoty IC<sub>50</sub> roskovitinu a jeho pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového bioisosteru jsou shrnuty v Tab. 5. Studie krystalické struktury komplexů s kinázou CDK2/cyklin A ukázaly, že se oba inhibitory váží k molekule enzymu stejným způsobem. Antiproliferační aktivita **XXIX** byla testována u více různých typů nádorových buněčných linií (Bettayeb a kol., 2008). Výsledky shrnuje Tab. 6.



**XXIX**

Obr. 25: Struktura bioisosteru roskovitinu N-&-N1 (GP0210).

Tab. 5: Porovnání hodnot  $IC_{50}$  roskovitinu a jeho bioisosteru N-&-N1 u testovaných enzymů (Bettayeb a kol., 2008).

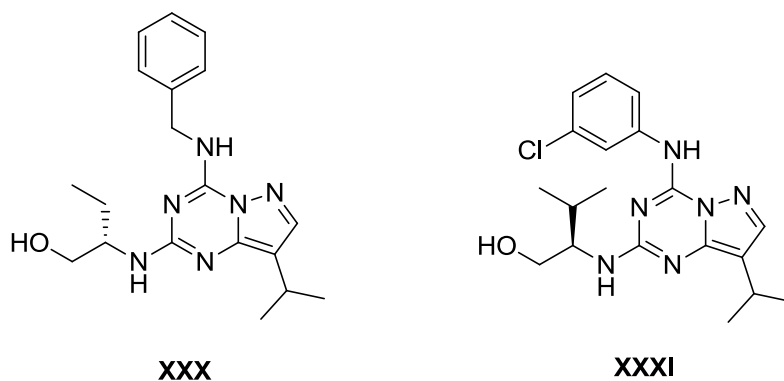
kináza	$IC_{50}$ (roskovitin) [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ (N-&-N1) [ $\mu$ M]
CDK1/cyklin B	0,33	0,07
CDK2/cyklin A	0,22	0,04
CDK2/cyklin E	0,15	0,02
CDK5/p25	0,27	0,07
CDK7/cyklin H	0,80	0,50
CDK9/cyklin T	0,23	0,04
CK1 $\delta/\epsilon$	4,00	1,20
Dyrk1A	3,00	1,30
Erk2	11,00	18,00
GSK-3 $\alpha/\beta$	60,00	11,00

Tab. 6: Porovnání hodnot  $IC_{50}$  roskovitinu a jeho bioisosteru N-&-N1 u testovaných buněčných linií (Bettayeb a kol., 2008).

buněčná linie	$IC_{50}$ (roskovitin) [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ (N-&-N1) [ $\mu$ M]
HCT116 (kolorektální karcinom)	20,80	2,40
MDA-MB-231 (rakovinné buňky prsu)	29,50	8,00
Huh7 (hepatom)	23,80	3,80
F1 (hepatom)	31,00	6,90
SH-SY5Y (neuroblast)	17,20	2,60
HEK293 (embryonální rakovinné buňky ledvin)	47,70	7,60

Na základě velice pozitivních výsledků týkajících se inhibitoru **XXIX** byly následně připraveny další dva pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty. Bioisoster

roskovitinu GP0211 (**XXX**) (Obr. 26) je (*S*)-izomerem **XXIX** a oproti roskovitinu vykazuje pěti až šestinásobnou inhibiční aktivitu. Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový bioisoster inhibitoru purvalanolu A (**XXXI**) (Obr. 26) také vykazuje větší aktivitu než původní purinový cyklus, je ovšem inaktivní vůči kinázám CDK7 a CDK9 (Popowycz a kol., 2009). Přehled hodnot  $IC_{50}$  derivátů **XXIX**, **XXX** a **XXXI** vůči testovaným kinázám uvádí Tab. 7.



Obr. 26: Struktury pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů odvozených od roskovitinu (**XXX**) a purvalanolu A (**XXXI**).

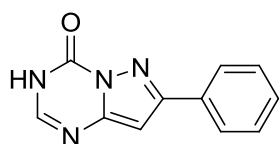
Tab. 7: Hodnoty  $IC_{50}$  inhibitorů roskovitinu, purvalanolu A a pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů **XXIX**, **XXX** a **XXXI** (Popowycz a kol., 2009).

inhibitor	CDK1/	CDK2/	CDK5/	CDK7/	CDK9/
	cyklin B [ $\mu$ M]	cyklin A [ $\mu$ M]	p25 [ $\mu$ M]	cyklin H [ $\mu$ M]	cyklin T [ $\mu$ M]
roskovitin	0,330	0,220	0,270	0,800	0,230
purvalanol A	0,004	0,070	0,075	-	-
<b>XXIX</b>	0,073	0,040	0,070	0,500	0,043
<b>XXX</b>	-	-	0,130	-	-
<b>XXXI</b>	0,080	0,060	0,060	>100	>100

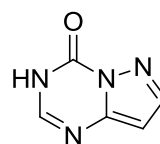
Deriváty pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu se projeví jako velice slibné látky v rámci inhibice nejen enzymů kinázového charakteru. 8-fenyl-5-aza-9-deazahypoxanthin (**XXXII**) a 5-aza-9-deazahypoxanthin (**XXXIII**), které jsou uvedeny



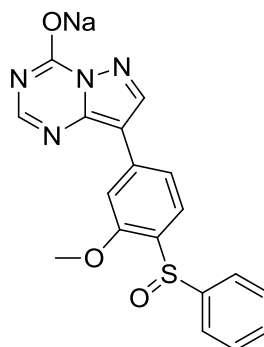
na Obr. 27, mají významnou inhibiční aktivitu vůči xantin oxidáze (XO), (Robins a kol., 1985). Xantinoxidáza, jako součást purinového katabolismu, katalyzuje oxidaci hypoxantinu na xantin a následně na kyselinu močovou a je důležitým ukazatelem hyperurikemie související například se vznikem dny (Haines a kol., 2018). Hodnoty  $IC_{50}$  vůči xantinoxidáze byly v případě **XXXII** 84  $\mu$ M a u **XXXIII** 47 nM (Robins a kol., 1985). Inhibiční účinek pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového cyklu proti xantinoxidáze se potvrdil také v *in vitro* i *in vivo* testech v případě inhibitoru BOF 4272, respektive monohydrátu 8-(3-methoxy-4-fenylsulfinylfenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-olátu sodného (**XXXIV**) (Obr. 27), (Matsugi a kol., 1995; Okamoto a Nishino, 1995; Naito a kol., 2000; Uematsu a Nakashima, 1994). (*S*)-(-)-enantiomer s hodnotou  $K_i = 1,2$  nM se oproti (*R*)-(+)-enantiomeru s  $K_i = 300$  nM projevil jako účinnější inhibitor (Okamoto a Nishino, 1995).



**XXXII**  
 $IC_{50}$  (XO) = 47 nM



**XXXIII**  
 $IC_{50}$  (XO) = 84 000 nM

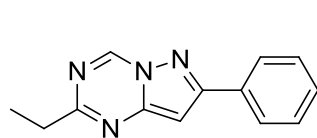


**XXXIV**  
(*S*)-(-)-izomer  $K_i$  (XO) = 1,2 nM  
(*R*)-(+)-izomer  $K_i$  (XO) = 300 nM

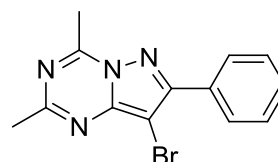
Obr. 27: Struktury tří významných inhibitorů xantinoxidázy s pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinovým heterocyklem.

Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny jsou také potenciálními inhibitory skupiny enzymů, které označujeme jako cycklické nukleotidfosfodiesterázy (PDE), (Senga a kol., 1982; Raboisson a kol., 2008). Tyta skupina enzymů, zahrnující 11 izoenzymatických rodin,

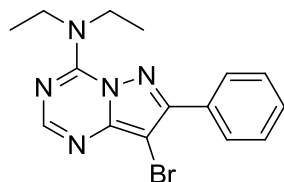
obecně umožňuje hydrolýzu molekul cAMP a cGMP a je tak významnou součástí intracelulární signalizace a vzniku případných patologických procesů (Jackson a kol., 2014; Keravis a Lugnier, 2012). U několika pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů byla testována inhibiční aktivita vůči cAMP PDE izolované z mozkové, srdeční a plicní zvířecí tkáně při porovnání s léčivem theofylinem. Derivát 2-ethyl-7-fenylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XXXV**) byl oproti theofylinu 97x účinnější. Dalším derivátem s obdobným účinkem pak byl 8-brom-2,4-dimethyl-7-fenylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XXXVI**). Jako nejúčinnější látka se ovšem projevil 8-brom-4-(diethylamino)-7-fenylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XXXVII**), který je oproti theofylinu 185x účinnější vůči plicní formě PDE (Senga a kol., 1982). Mezi novější významné pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty s inhibiční aktivitou vůči PDE pak patří 8-(2-methoxybenzyl)-4-(*N*-methylamino)-2-*n*-propylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XXXVIII**) a 2-trifluoromethyl-8-(2-methoxybenzyl)-4-(*N*-methylamino)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XXXIX**), které byly identifikovány při hledání nových látek pro terapii autoimunitních a zánětlivých procesů. **XXXVIII** i **XXXIX** jsou selektivními inhibitory vůči PDE4 s hodnotami IC<sub>50</sub> 13 a 11 nM (Raboisson a kol., 2008). Všechny zmíněné látky s inhibiční aktivitou vůči PDE jsou uvedeny na Obr. 28.



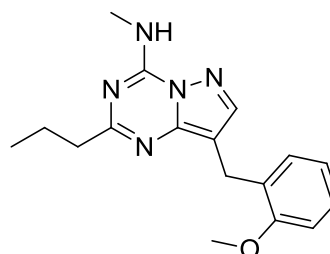
XXXV



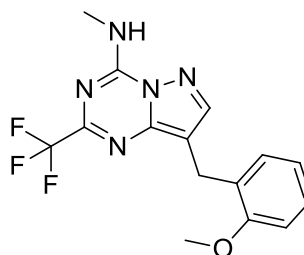
XXXVI



XXXVII



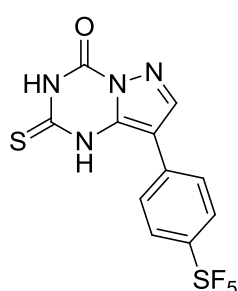
XXXVIII  
IC<sub>50</sub> (PDE4) = 13 nM



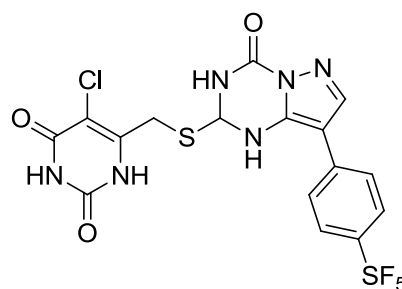
XXXIX  
IC<sub>50</sub> (PDE4) = 11 nM

Obr. 28: Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty s PDE inhibiční aktivitou.

Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny vykazují také inhibiční aktivitu vůči thymidin fosforyláze (TP), která podporuje nádorový růst a vznik metastáz, a je proto významným terapeutickým cílem. Syntetizováno a testováno bylo více než 50 různých pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-dionů a pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2-thioxo-4-onů. Největší potenciál vykazoval pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2-thioxo-4-onový derivát s navázanou 4-pentafluorosulfur-fenylovou strukturou v pozici C8 (**XL**) (Obr. 29). S hodnotou IC<sub>50</sub> = 0,04 μM je derivát **XL** 800x účinnější TP inhibitor v porovnání s referenčním TP inhibitorem 7-deazaxantinem. Dále bylo zjištěno, že **XL** je nekompetitivním inhibitorem a k TP se zřejmě váže v jiném místě než molekula substrátu (Sun a kol., 2013a). Jako TP inhibitory byly také navrženy a připraveny pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny s navázaným 5-chloruracilem v pozici C2. Nejúčinnější derivát (**XLI**) (Obr. 29) má hodnotu IC<sub>50</sub> (TP) = 0,36 μM. Studie enzymatické kinetiky ukázala, že se k molekule TP může vázat na dvou různých místech (Sun a kol., 2013b).



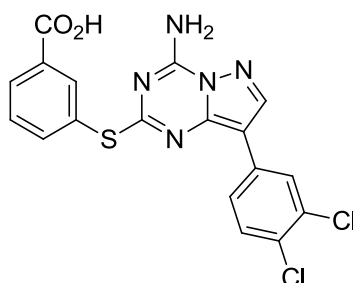
**XL**  
**IC<sub>50</sub> (TP) = 0,04 μM**



**XLI**  
**IC<sub>50</sub> (TP) = 0,36 μM**

Obr. 29: Struktury dvou významných TP inhibitorů s příslušnými hodnotami IC<sub>50</sub>.

U 4-aminopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů byla také prokázána inhibiční aktivita proti bakteriálnímu enzymu DNA gyráze, která je významným cílem v rámci antibakteriální terapie. Největší potenciál vykazovala 3-((4-amino-8-(3,4-dichlorfenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2-yl)thio)benzoová kyselina (**XLII**) (Obr. 30) se stejnou hodnotou 0,5 μg/ml u MNEC (maximální neefektivní koncentrace) vůči gyráze a MIC (minimální inhibiční koncentrace) proti bakterii *Staphylococcus pyogenes* (Lübbers a kol., 2000).

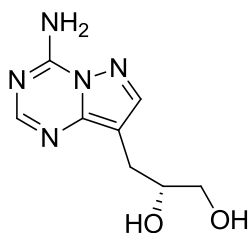


**XLII**  
**MNEC (gyráza) = 0,5 μg/ml**  
**MIC (*S. pyogenes*) = 0,5 μg/ml**

Obr. 30: Struktura pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového derivátu s inhibiční aktivitou vůči bakteriální DNA gyráze.

Připraven a popsán byl také pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový derivát s inhibiční aktivitou vůči enzymu *S*-adenosylhomocysteinázy (AHCY), (Ullas a kol., 1988). AHCY katalyzuje reverzibilní hydrolýzu *S*-adenosyl-L-homocysteinu na adenosin a homocystein (de La Haba a Cantoni, 1959). (*R*)-3-(4-aminopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-

triazin-8-yl)propan-1,2-diol (**XLIII**) (Obr. 31) inhibuje AHCY s hodnotou  $K_i = 334$  nM (Ullas a kol., 1988).

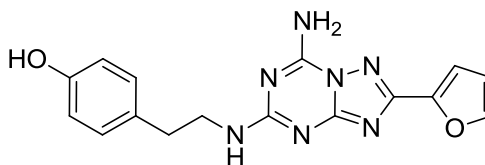


**XLIII**  
 $K_i$  (AHCY) = 334 nM

Obr. 31: Struktura pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového derivátu s inhibiční aktivitou vůči AHCY.

### 2.3.1.2 Receptorové ligandy

Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový heterocyklus se projevil jako vhodná struktura pro přípravu antagonistů adenosinových receptorů (AR), (EP 459702 A1; de Zwart a kol., 1999; WO 2004092170 A2). Jako příklad lze uvést 7-amino-2-(2-furyl)-5-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]amino[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin, respektive ZM241385 (**XLIV**) (Obr. 32). Derivát **XLIV** je významným antagonistou adenosinového receptoru  $A_{2A}$  s hodnotou  $K_i$  ( $A_{2A}$ ) = 1,78 nM (de Zwart a kol., 1999; Doré a kol., 2011). Receptor  $A_{2A}$  je jedním ze 4 podtypů adenosinového receptoru ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) a je důležitým cílem v rámci léčby kardiovaskulárních poruch a Parkinsonovy choroby (Sun a kol., 2017; de Lera Ruiz a kol., 2014). Vůči adenosinovému receptoru  $A_{2B}$  má **XLIV** hodnotu  $K_i$  již vyšší:  $K_i$  ( $A_{2B}$ ) = 16,5 nM (de Zwart a kol., 1999).

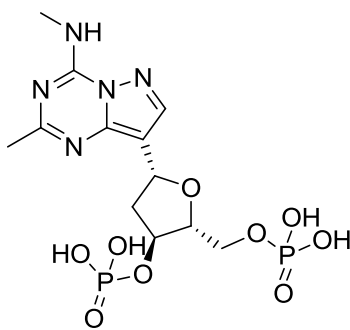


**XLIV**  
 $K_i$  ( $A_{2A}$ ) = 1,78 nM  
 $K_i$  ( $A_{2B}$ ) = 16,5 nM

Obr. 32: Struktura významného antagonisty receptoru  $A_{2A}$  ZM241385.

Dále se podařilo připravit několik potenciálních antagonistů purinergního receptoru  $P2Y_1$  s pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinovým skeletem (Raboisson a kol., 2002a). Receptor  $P2Y_1$  je lokalizovaný v různých tkáních a má strukturu typickou pro receptory

spřažené s G-proteinem. Je aktivován prostřednictvím adenosin-5'-difosfátu (ADP), případně od něj odvozených analogů a je nezbytný pro agregaci trombocytů (Raboisson a kol., 2002b). Nejvýznamnějším antagonistou je 2,*N*(6)-dimethyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisfosfátový strukturní analog (**XLV**) (Obr. 33). V rámci *in vitro* i *in vivo* testů se **XLV** projevil jako silný inhibitor ADP-indukované trombocytární agregace (Raboisson a kol., 2002a).

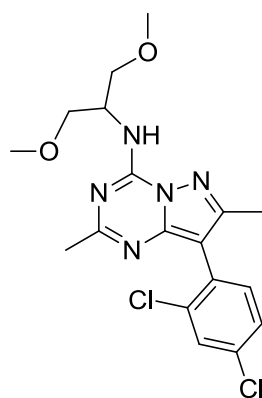


**XLV**

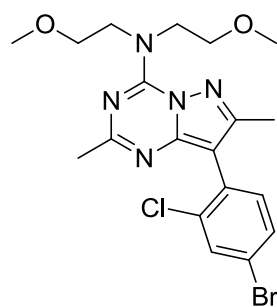
Obr. 33: Struktura pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového antagonisty purinergního receptoru P2Y<sub>1</sub>.

Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny jsou také významnými antagonisty receptoru pro *corticotropin-releasing factor* (CRF), (WO 1999067247 A1; US 20050113375 A1). CRF je hormonem a neurotransmitterem, který je uvolňován v mozku jako odezva na stres, endokrinní nebo imunitní reakce (Slater a kol., 2018). Připraveny a popsány byly čtyři větší skupiny pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů jako potenciálních CRF antagonistů (He a kol., 2000; Gilligan a kol., 2003; Gilligan a kol., 2009a; Gilligan a kol., 2009b ). První skupinu představují pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny substituované dichlorfenylem nebo bromchlorfenylem v pozici C8 (WO 1998003510 A1; He a kol., 2000). Mezi nejslibnější látky patří 8-(2,4-dichlorfenyl)-*N*-(1,3-dimethoxypropan-2-yl)-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**XLVI**), který je označován jako DMP 696. **XLVI** je nekompetitivním antagonistou s vysokou selektivitou i afinitou k receptoru CRF<sub>1</sub>. Má anxiolytický a antidepresivní účinek, dobrou biodostupnost při perorálním podání a vhodné farmakokinetické vlastnosti. Hodnota K<sub>i</sub> vůči CRF<sub>1</sub> je 1,7 nM (He a kol., 2000; McElroy a kol., 2002). Další významnou látkou antagonisticky působící vůči CRF<sub>1</sub> receptoru je 8-(4-brom-2-chlorfenyl)-*N,N*-bis(2-methoxyethyl)-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**XLVII**) s označením MJL-1-109-2. Hodnota K<sub>i</sub> vůči CRF<sub>1</sub> je zde téměř srovnatelná s **XLVI** (1,7 nM), (Jagoda a kol., 2003;

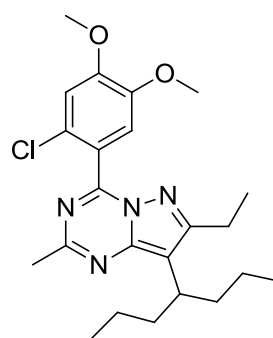
Zhao a kol., 2007). Významný zástupce druhé strukturálně odlišné skupiny pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových antagonistů, která zahrnuje několik derivátů s hodnotami  $K_i$  menšími než 10 nM, je 4-(2-chlor-4,5-dimethoxyfenyl)-7-ethyl-8-(heptan-4-yl)-2-methylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**XLVIII**). **XLVIII** vykazuje vysokou afinitu k oběma typům CRF receptorů (CRF<sub>1</sub> a CRF<sub>2</sub>) s hodnotou  $K_i(\text{CRF}) = 0,7$  nM (Gilligan a kol., 2003). Zmíněné deriváty **XLVI**, **XLVII** a **XLVIII** jsou uvedeny na Obr. 34. Třetí skupina pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových antagonistů zahrnuje novější 8-(4-methoxyfenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty. Nejlepší výsledky byly dosaženy v případě 8-(4-methoxy-2-methylfenyl)-*N,N*-bis(2-methoxyethyl)-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (**XLIX**), který díky vysoké selektivitě vůči receptoru CRF<sub>1</sub> (s  $\text{IC}_{50} = 4,7$  nM) a dobrému farmakokinetickému profilu postoupil do klinického testování (Gilligan a kol., 2009a). Poslední skupinu představují pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny substituované v pozici C8 pyridinem. Nejdůležitějším zástupcem je *N*-((*R*)-*sec*-butyl)-8-(6-methoxy-2-methylpyridin-3-yl)-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**L**) s hodnotou  $\text{IC}_{50}(\text{CRF}_1) = 6,1$  nM. **L** díky dobrým farmakokinetickým vlastnostem také postoupil do klinických testů (Gilligan a kol., 2009b). Novější deriváty **XLIX** a **L** jsou uvedeny na Obr. 35.



**XLVI**  
 $K_i$  (CRF<sub>1</sub>) = 1,7 nM

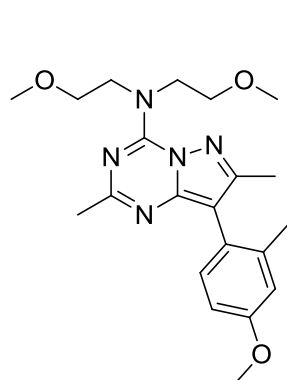


**XLVII**  
 $K_i$  (CRF<sub>1</sub>) = 1,9 nM

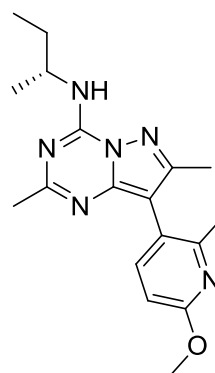


**XLVIII**  
 $K_i$  (CRF) = 0,7 nM

Obr. 34: Struktury pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinových antagonistů CRF receptoru **XLVI**, **XLVII** a **XLVIII** s příslušnými hodnotami  $K_i$ .



**XLIX**  
 $IC_{50}$  (CRF<sub>1</sub>) = 4,7 nM

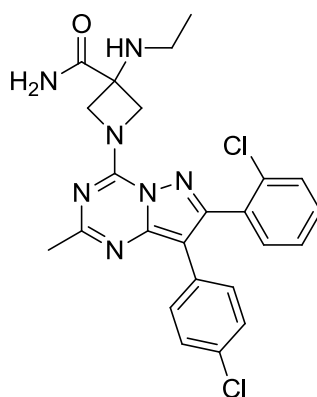


**L**  
 $IC_{50}$  (CRF<sub>1</sub>) = 6,1 nM

Obr. 35: Struktury novějších pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinových antagonistů CRF receptoru **XLIX** a **L** s příslušnými hodnotami  $IC_{50}$ .



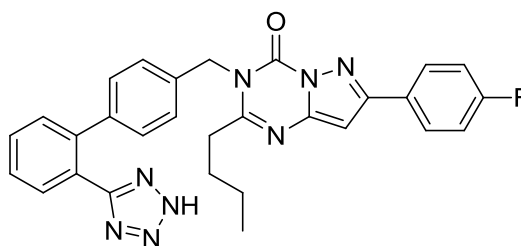
Dále byly syntetizovány pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny s antagonistickým účinkem vůči kanabinoidním receptorům (CB) s terapeutickým potenciálem v rámci onemocnění centrální nervové soustavy (WO 2004069837 A1; WO 2005049615 A1; WO 2006131807 A1). Za zmínku stojí 2-methylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový derivát substituovaný v pozici C7 a C8 chlorfenylem a v pozici C4 3-ethylaminoacetid-3-karboxamidem (**LI**) (Obr. 36). **LI** se ve formě benzensulfonové soli ke kanabinoidnímu receptoru CB<sub>1</sub> váže s vysokou afinitou i selektivitou s  $K_i(\text{CB}_1) = 0,33 \text{ nM}$ . Dále bylo zjištěno, že antagonisté CB<sub>1</sub> typu derivátu **LI** mohou zvýšit účinek dopaminomimetik v rámci terapie Parkinsonovy choroby (Cao a kol., 2007).



**LI**  
 $K_i(\text{CB}_1) = 0,33 \text{ nM}$

Obr. 36: Struktura pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového antagonisty receptoru CB<sub>1</sub> s příslušnou hodnotou  $K_i$ .

Některé 4-oxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny substituované v pozicích N3, C4 a C7 se projeví jako antagonisté receptorů pro angiotenzin II (AII). Derivát **LII** (Obr. 37) projevil v *in vitro* experimentech vysokou afinitu k AII receptorům a v *in vivo* testech způsobil značné snížení AII receptorové odpovědi. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  vůči AII receptoru byla v tomto případě 63 nM (US 5358947 A).

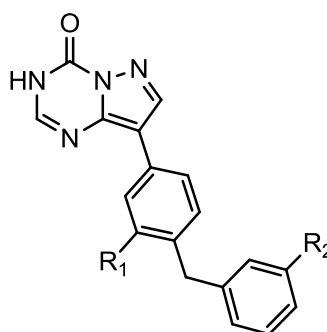


**LII**

**IC<sub>50</sub> (AII) = 63 nM**

*Obr. 37: Struktura 4-oxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinového AII antagonisty s příslušnou hodnotou IC<sub>50</sub>.*

Dále bylo syntetizováno více variant 8-aryl-4-oxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinové struktury antagonisticky působící vůči androgennímu receptoru (AR) s hodnotami IC<sub>50</sub> v rozmezí 12 až 23 nM (**LIII**) (Obr. 38), (EP 594149). Deriváty 4-amino-8-aryl-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinu s různými substituenty v pozicích C2, C7 a C8 byly identifikovány jako modulátory receptoru neuropeptidu Y<sub>1</sub> (WO 2001023387; WO 2001023388 A3). Některé další látky odvozené od pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinového cyklu fungují také jako ligandy receptoru pro 5-hydroxytryptamin (5-HT<sub>6</sub>), (EP 0941994 A1).



**LIII**

R<sub>1</sub> = Me, OMe

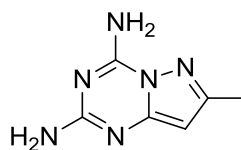
R<sub>2</sub> = Me, OMe

**IC<sub>50</sub> (AR) = 12 - 23 nM**

*Obr. 38: Obecná struktura pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinového antagonisty AR s příslušnými hodnotami IC<sub>50</sub>.*

### 2.3.1.3 Další biologické vlastnosti

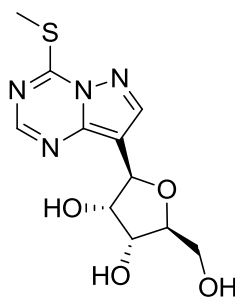
Kromě výše uvedených vlastností pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů je třeba také zmínit protizánětlivé, antialergické a bronchodilatační vlastnosti 7-methylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-diaminu, který je označován jako LA2851 nebo Dametralast (**LIV**) (Obr. 39) a je velice slibnou látkou pro léčbu respiračních onemocnění včetně astmatu (Junien a kol., 1981; Junien a kol., 1982). Prokázán byl také jeho inhibiční účinek vůči enzymu PDE, přestože se nejednalo o primární záměr studie, a při studii jeho mechanismu účinku bylo zjištěno, že ovlivňuje metabolické děje spojené s lipoxygenázou (Junien a kol., 1982; Guillaume a Lakatos, 1983). U látek odvozených od **LIV** se v preklinických i následných klinických testech projevil velký potenciál nejen v rámci terapie astmatu. Mají také částečný vliv na kardiovaskulární systém a centrální nervovou soustavu a s největší pravděpodobností fungují jako antagonisté AR (DE 2900288 A1).



**LIV**

Obr. 39: Struktura léčiva Dametralastu (LA2851).

Připravit se také podařilo několik pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových nukleosidů, u kterých byla v případě leukémií prokázána antiproliferační aktivita. Látkou s největší biologickou aktivitou byl 4-methylthio-8-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**LV**), (Tam a kol., 1979). Jeho struktura je uvedena na Obr. 40.



**LV**

Obr. 40: Struktura pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového nukleosidu s antileukemickou aktivitou.

### 2.3.2 Syntetické přístupy vedoucí k přípravě pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu

Na základě publikované literatury lze říci, že obecně existují 4 možné postupy, jak připravit pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový heterocyklus:

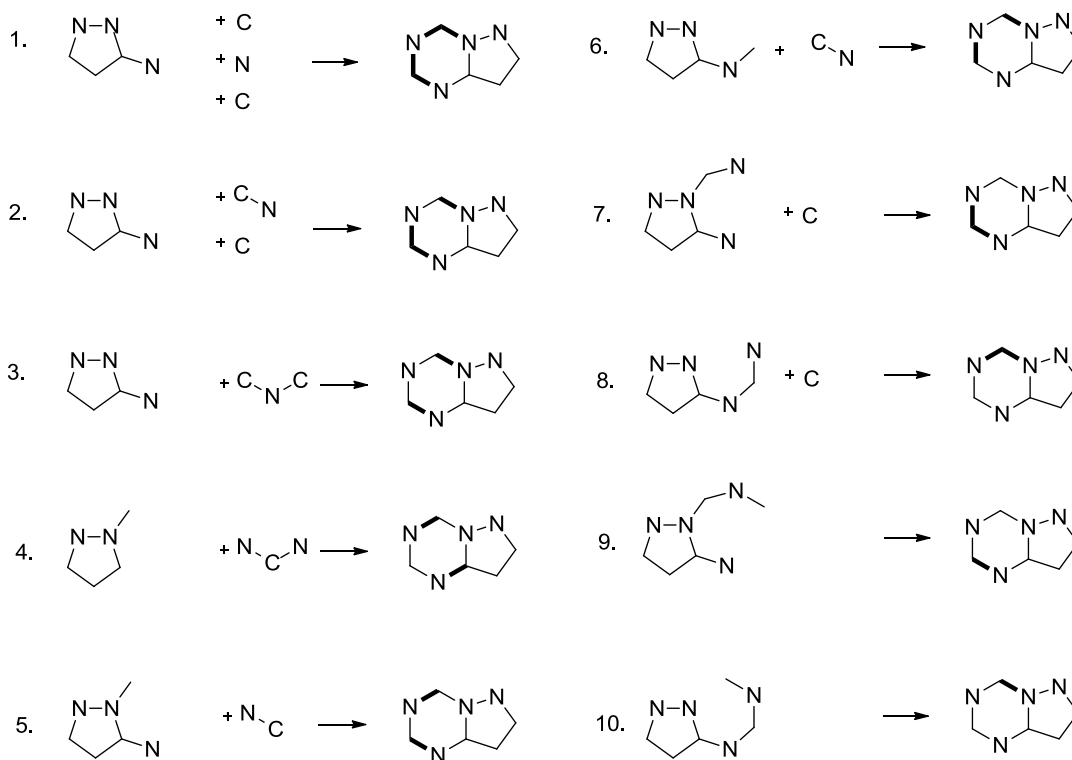
1. připojení 1,3,5-triazinového cyklu na připravený pyrazolový cyklus (Nie a kol., 2007),
2. připojení pyrazolového cyklu na připravený 1,3,5-triazinový cyklus (Stevens a kol., 1984),
3. současná syntéza pyrazolového a 1,3,5-triazinového cyklu (Abed a kol., 1988),
4. syntéza pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu pomocí transformačních reakcí (Stevens a kol., 1984).

#### 2.3.2.1 Připojení 1,3,5-triazinového cyklu na připravený pyrazolový cyklus

Napojení 1,3,5 triazinové struktury na pyrazolový cyklus je nejčastěji využívanou metodou pro přípravu pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu (Salem a kol., 1993; Nie a kol., 2007; Bekircan a kol., 2005; Lim a kol., 2014). Připravený pyrazolový cyklus může být cyklizován na pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin 10 různými způsoby (viz Obr. 41):

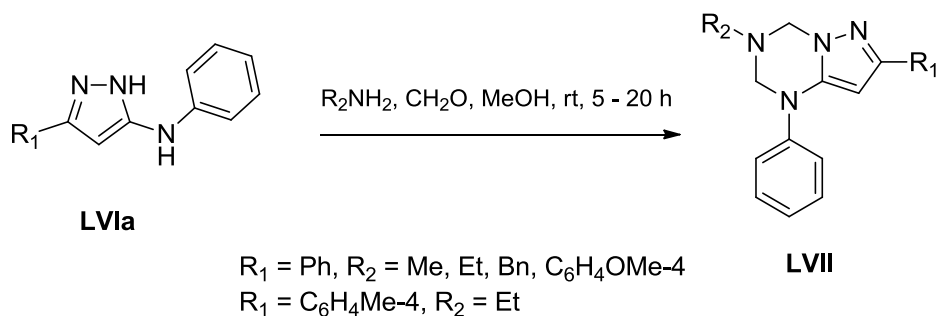
1. cyklizací 3(5)-aminopyrazolů s 2 atomy uhlíku a 1 atomem dusíku (Vishwakarma a kol., 1988),
2. cyklizací 3(5)-aminopyrazolů s reaktanty poskytujícími C-N fragment a 1 atom uhlíku (Graubaus a Schweim, 1991),
3. cyklizací 3(5)-aminopyrazolů s reaktanty poskytujícími C-N-C fragment (Bekircan a kol., 2005),
4. cyklizací 1-acylpyrazolidindionů s reaktanty poskytujícími N-C-N fragment (Salem a kol., 1993),
5. cyklizací 5-aminopyrazolů s uhlíkovým atomem navázaným v pozici N1 s reaktanty poskytujícími C-N fragment (Fischer a kol., 1976),
6. cyklizací pyrazolů s navázaným N-C fragmentem v pozici C3(5) s reaktanty poskytujícími C-N fragment (DE 3644343 A1),
7. cyklizací 5-aminopyrazolů s navázaným C-N fragmentem v pozici N1 s jedním uhlíkovým atomem (Senga a kol., 1975),
8. cyklizací pyrazolů obsahujícími N-C-N fragment v pozici C3(5) s jedním uhlíkovým atomem (Novinson a kol., 1974),

9. intramolekulární cyklizací 5-aminopyrazolů obsahujícími C-N-C fragment v pozici N1 (Nie a kol., 2007),
10. intramolekulární cyklizací pyrazolů obsahujícími N-C-N-C fragment v C3(5) pozici (Strohmeyer a kol., 1985).



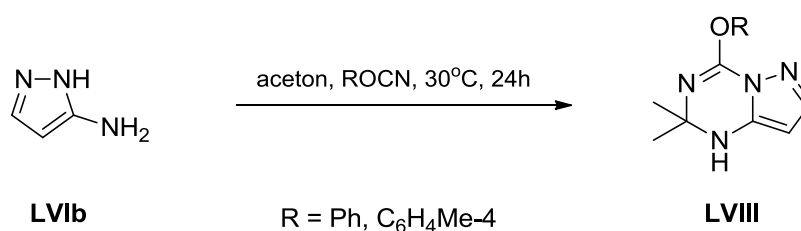
Obr. 41: Obecné názorné schéma způsobů tvorby pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinového heterocyklu připojením 1,3,5-triazinového cyklu k pyrazolové struktuře.

Jako příklad cyklizace 3(5)-aminopyrazolů s 2 atomy uhlíku a 1 atomem dusíku lze uvést kondenzační reakce 3(5)-fenylaminopyrazolů (**LVia**) s různými variantami primárních aminů za přítomnosti formaldehydu a vzniku 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinových derivátů (**LVII**), (Vishwakarma a kol., 1988). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 42.



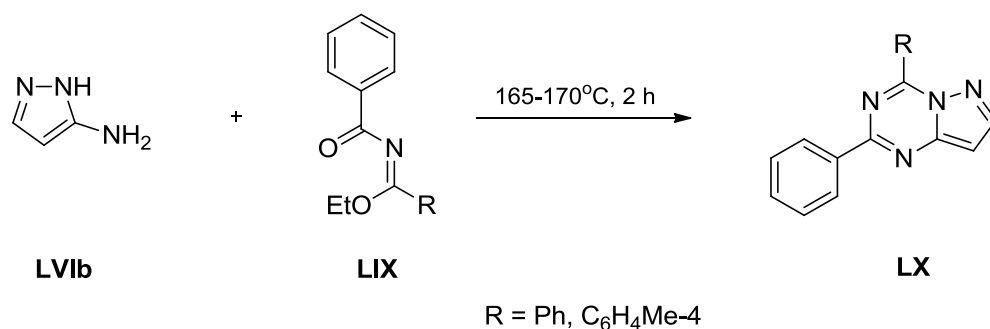
Obr. 42: Schéma přípravy 1-fenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinových derivátů reakcí 3(5)-fenylaminopyrazolů s primárními aminy.

V případě druhé uvedené možnosti, tedy cyklizace 3(5)-aminopyrazolů s reaktanty poskytujícími C-N fragment a 1 atom uhlíku, lze uvést reakci 3(5)-aminopyrazolu (**LVIIb**) s arylkyanáty za použití acetonu jako rozpouštědla, reakce vede ke vzniku 4-aryloxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů (**LVIII**), (Graubaum a Schweim, 1991). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 43.



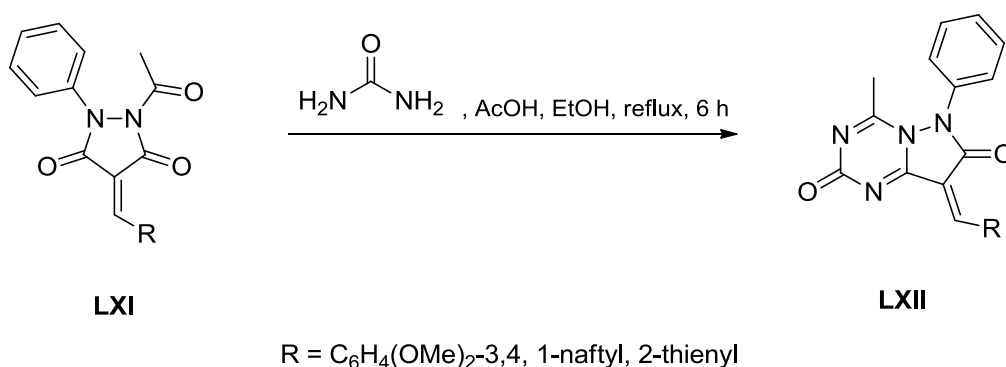
Obr. 43: Schéma přípravy 4-aryloxy-2,2-dimethyl-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů reakcí 3(5)-aminopyrazolu s arylkyanáty.

Názorný příklad cyklizace 3(5)-aminopyrazolů s reaktanty poskytujícími C-N-C fragment představuje reakce 3(5)-aminopyrazolu (**LVIIb**) s ethyl-N-benzoylimidátů (**LIX**), při které vznikají deriváty 2,4-diarylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinové struktury (**LX**), (Bekircan a kol., 2005). Schéma reakce je znázorněno na Obr. 44.



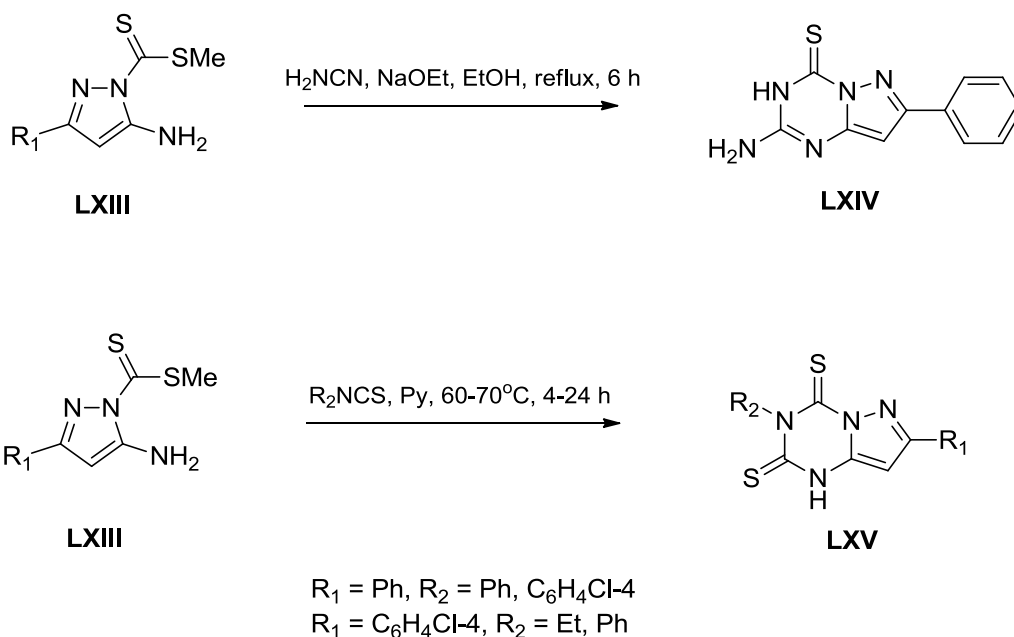
Obr. 44: Schéma přípravy 2,4-diarylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů reakcí 3(5)-aminopyrazolu s ethyl-N-benzoylimidáty.

Čtvrtou možností, jak připravit pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinový heterocyklus připojením 1,3,5-triazinu k pyrazolové struktuře, představuje reakce *N*-acetylpyrazolidindionů (LXI) s močovinou v ethanolu v přítomnosti kyseliny octové za vzniku 4-methyl-6-fenylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-2,7-dionových derivátů (LXII), (Salem a kol., 1993). Schéma reakce je znázorněno na Obr. 45.



Obr. 45: Schéma přípravy 4-methyl-6-fenylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-2,7-dionových derivátů reakcí *N*-acetylpyrazolidindionů s močovinou.

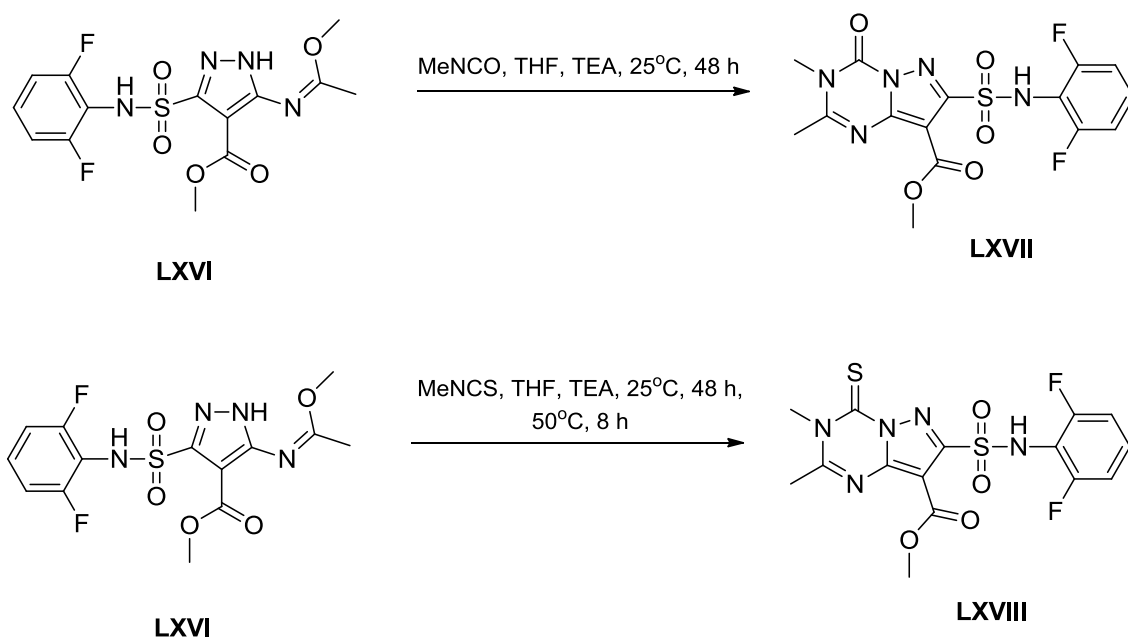
Další možností je cyklizace 5-aminopyrazolů s uhlíkovým atomem navázaným v pozici N1 s reaktanty poskytujícími C-N fragment. Tento typ heterocyklizace představuje reakce 5-amino-3-arylpyrazol-1-karbodithioátů (LXIII) s kyanamidem nebo isothiokyanáty za vzniku 2-amino-4-thioxo- nebo 2,4-dithioxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů (LXIV a LXV), (Fischer a kol., 1976). Schémata obou typů reakcí jsou znázorněna na Obr. 46.



Obr. 46: Schéma přípravy 2-amino-4-thio- nebo 2,4-dithioxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinů reakcí s kyanamidem nebo isokyanáty.

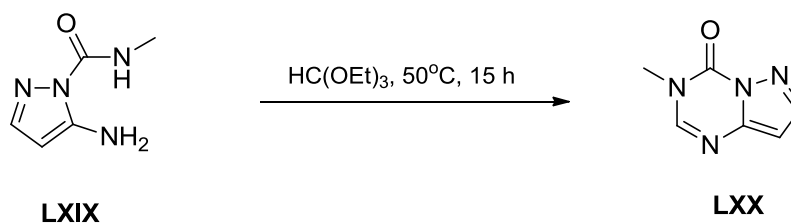
V pořadí šestou možností je cyklizační reakce pyrazolových derivátů s navázaným N-C fragmentem v pozici C3(5) s reaktanty poskytujícími C-N fragment. Zde lze jako názorný příklad uvést reakci (*Z*)-methyl-3-(*N*-(2,6-difluorofenyl)sulfamoyl)-5-((1-methoxyethyliden)amino)-1*H*-pyrazol-4-karboxylátu (**LXVI**) s methyl isokyanátem nebo methyl isothiokyanátem za vzniku 4-oxo- nebo 4-thioxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (**LXVII** a **LXVIII**), (DE 3644343 A1). Schémata obou reakcí jsou uvedena na Obr. 47.





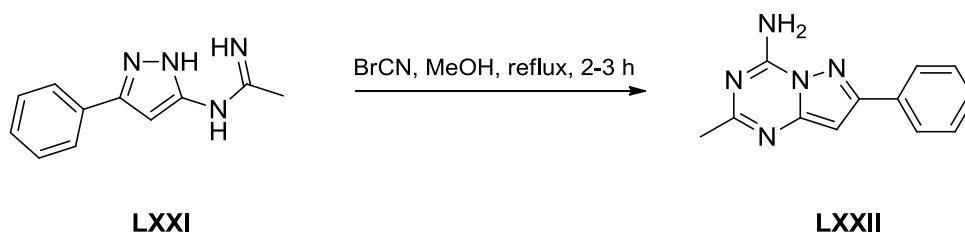
Obr. 47: Schéma přípravy 4-oxo- nebo 4-thioxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinových derivátů reakcí s methyl isokyanátem nebo methyl isothiokyanátem.

Jako příklad cyklizace 5-aminopyrazolového derivátu s navázaným C-N fragmentem v pozici N1 s jedním uhlíkovým atomem lze uvést reakci 5-amino-1-methylkarbamoylpyrazolu (**LXIX**) s triethyl orthoformátem za vzniku 3-methyl-4-oxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinové struktury (**LXX**), (Senga a kol., 1975). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 48.



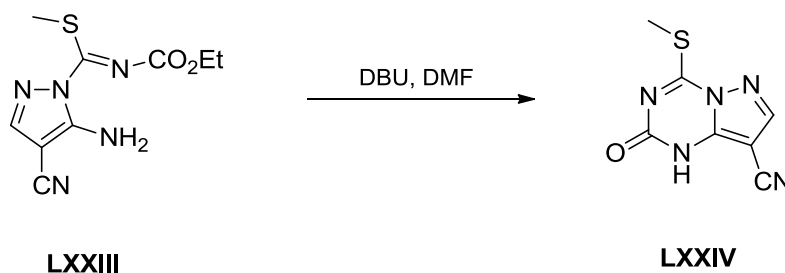
Obr. 48: Schéma přípravy 3-methyl-4-oxopyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinu reakcí 5-amino-1-methylkarbamoylpyrazolu s triethyl orthoformátem.

Další možností je cyklizace pyrazolů obsahujícími N-C-N fragment v pozici C3(5) s jedním uhlíkovým atomem. Zde lze uvést reakci *N*-(3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)acetimidamidu (**LXXI**) s bromkyanem, při které vzniká 4-amino-2-methyl-7-fenylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin (**LXXII**), (Novinson a kol., 1974). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 49.



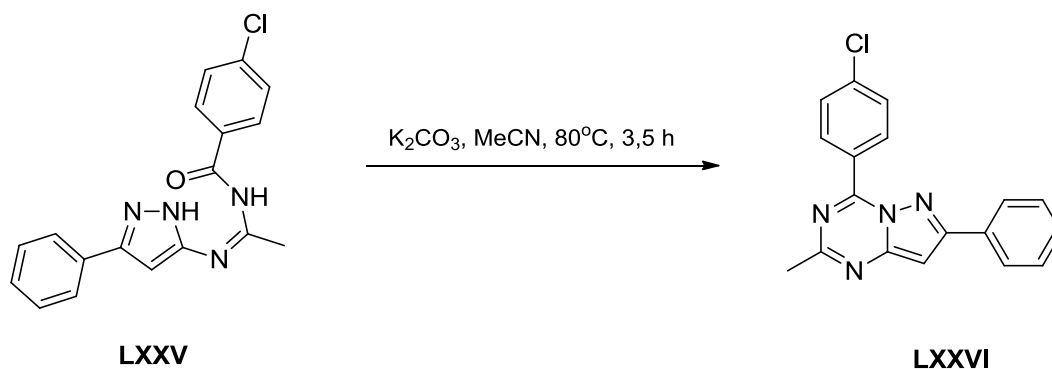
Obr. 49: Schéma přípravy 4-amino-2-methyl-7-fenylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinu reakcí *N*-(3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)acetimidamidu s bromkyanem.

Intramolekulární cyklizace 5-aminopyrazolů, které mají C-N-C fragment navázaný v pozici N1, představuje devátou možnost přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu pomocí napojení 1,3,5-triazinové struktury k pyrazolovému kruhu. Příkladem může být heterocyklizace (*Z*)-methyl-5-amino-4-kyano-*N*-(ethoxykarbonyl)-1*H*-pyrazol-1-karbimidothioátu (**LXXIII**) v přítomnosti diazabicykloundekanu za vzniku 8-kyano-4-methylthio-2-oxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu (**LXXIV**), (Nie a kol., 2007). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 50.



Obr. 50: Schéma heterocyklizace (*Z*)-methyl-5-amino-4-kyano-*N*-(ethoxykarbonyl)-1*H*-pyrazol-1-karbimidothioátu v přítomnosti DBU.

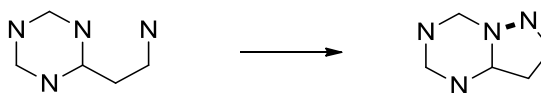
Poslední variantou je intramolekulární cyklizace pyrazolů obsahujícími N-C-N-C fragment v C3(5) pozici. Základními předpoklady pro průběh reakce jsou vyšší teplota a bazické prostředí. Příkladem je heterocyklizace (*Z*)-4-chlor-*N*-(1-((3-fenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)imino)ethyl)benzamidů (**LXXV**), kdy v přítomnosti uhličitanu draselného vzniká 4-(4-chlorfenyl)-2-methyl-7-fenylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**LXXVI**), (Strohmeier a kol., 1985). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 51.



Obr. 51: Schéma přípravy 4-(4-chlorfenyl)-2-methyl-7-fenylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinu heterocyklizací (Z)-4-chlor-N-(1-((3-fenyl-1H-pyrazol-5-yl)imino)ethyl)benzamidů.

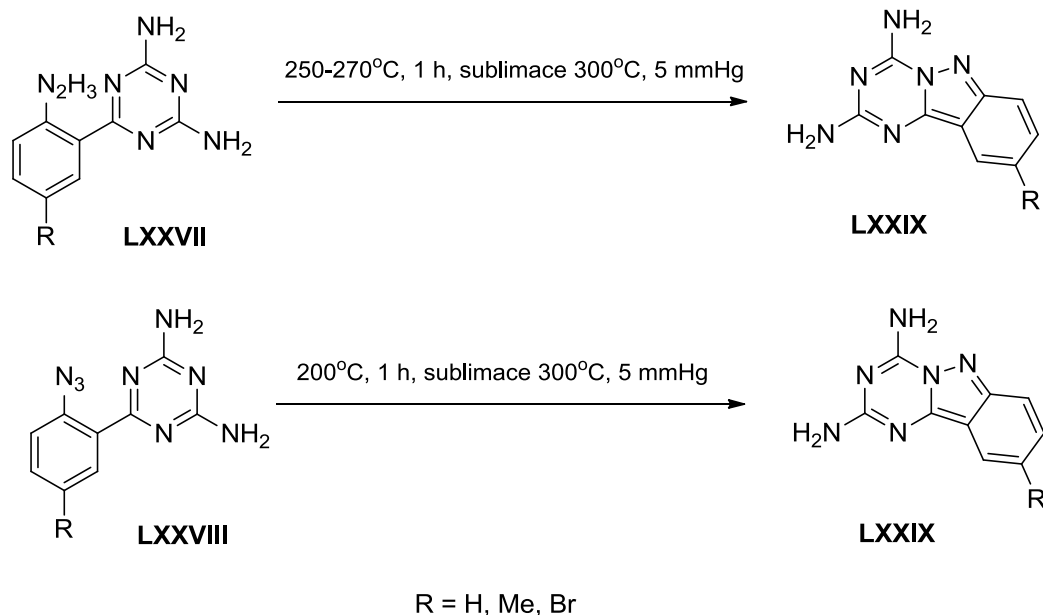
### 2.3.2.2 Připojení pyrazolového cyklu na připravený 1,3,5-triazinový cyklus

Pro vytvoření pyrazolového cyklu na připravený 1,3,5-triazinový cyklus existuje jen jediná možnost, a to intramolekulární cyklizace 1,3,5-triazinu s navázaným C-C-N fragmentem, jak je znázorněno na Obr. 52 (Gescher a kol., 1977; Stevens a kol., 1984).



Obr. 52: Názorné obecné schéma tvorby pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinového heterocyklu napojením pyrazolového cyklu na 1,3,5-triazin.

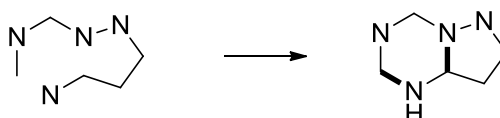
Tento syntetický přístup zahrnuje rozkladné reakce hydrazinových nebo azidových derivátů 6-fenyl-1,3,5-triazin-2,4-diaminu (**LXXVII** a **LXXVIII**) za vzniku 9-methyl-1,3,5-triazino[1,2-*b*]indazol-2,4-diaminů (**LXXIX**) a uvolnění amoniaku nebo dusíku (Gescher a kol., 1977; Stevens a kol., 1984). Schémata obou typů reakcí jsou uvedeny na Obr. 53.



Obr. 53: Schéma přípravy 9-methyl-1,3,5-triazino[1,2-b]indazol-2,4-diaminů rozkladnou reakcí hydrazinových nebo azidových derivátů 6-fenyl-1,3,5-triazin-2,4-diaminu.

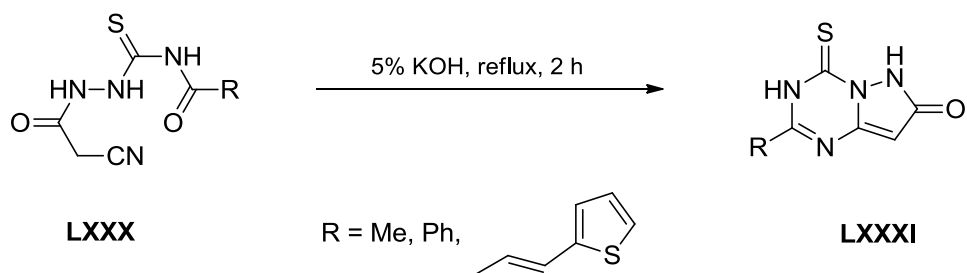
### 2.3.2.3 Současná syntéza pyrazolového a 1,3,5-triazinového cyklu

Pouze jedna varianta cyklizační reakce umožňuje současné zacyklení pyrazolového a triazinového cyklu za vzniku pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu. Jedná se o intramolekulární cyklizaci otevřené řetězce obsahujícího 5 atomů uhlíku a 4 atomy dusíku (tedy C<sub>5</sub>N<sub>4</sub>), viz Obr. 54 (Elmoghayar a kol., 1984; Elmoghayar a kol., 1985).



Obr. 54: Názorné obecné schéma tvorby pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu současným zacyklením pyrazolového i triazinového cyklu.

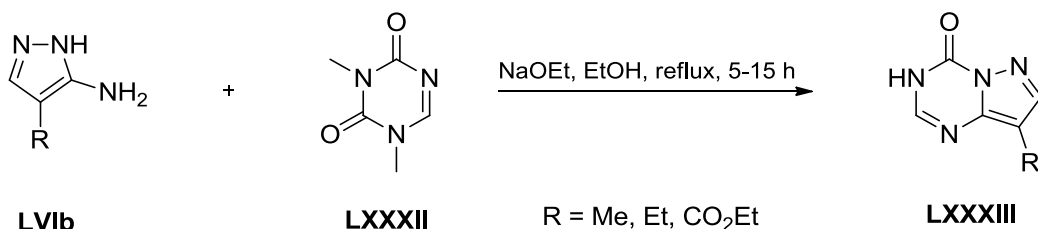
Jako příklad lze uvést intramolekulární cyklizaci *N*-acyl-2-kyanoacetylthiosemikarbasidů (LXXX), při které vznikají 7-oxo-4-thioxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty (LXXXI) s navázanými různými substituenty v pozici C2 (Abed a kol., 1988; Elmoghayar a kol., 1984; Elmoghayar a kol., 1985). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 55.



Obr. 55: Schéma přípravy 7-oxo-4-thioxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů intramolekulární cyklizací *N*-acyl-2-kyanoacetylthiosemikarbasidů.

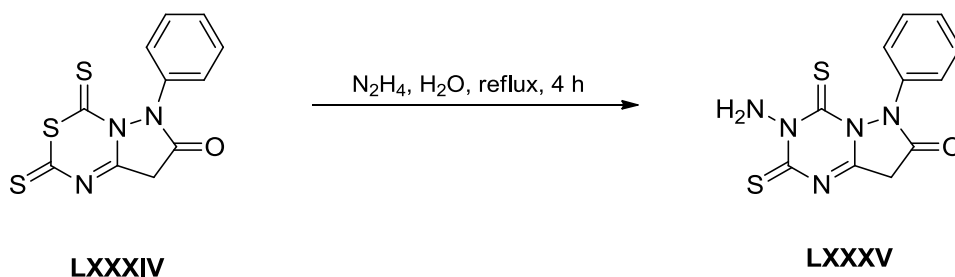
### 2.3.2.4 Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu pomocí transformačních reakcí

Tato strategie přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů zahrnuje 3 varianty reakcí (Chu a kol., 1986; El-Saraf a kol., 2003; Gescher a kol., 1977; Stevens a kol., 1984). První možnost lze demonstrovat reakcí derivátů 3(5)-aminopyrazolu (**LVIb**) s 1,3-dimethyl-5-azauracilem (**LXXXII**), při které dochází ke vzniku 4-oxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů (**LXXXIII**). Tato varianta byla využita při syntéze nukleosidů odvozených od pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu (Chu a kol., 1986). Schéma reakce je uvedeno na Obr. 56.



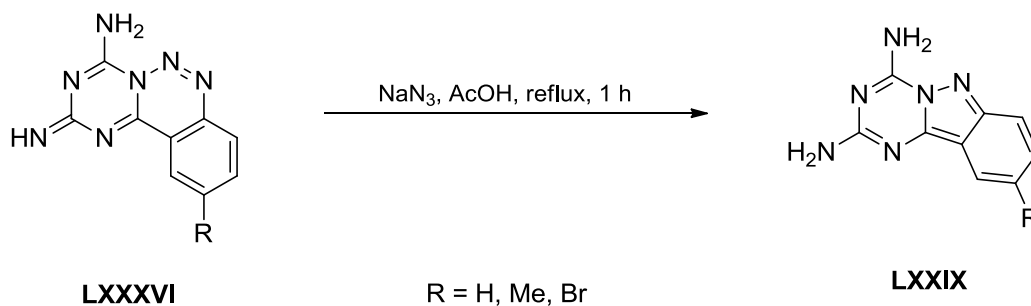
Obr. 56: Příprava 4-oxopyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů transformací 3(5)-aminopyrazolů a 1,3-dimethyl-5-azauracilu.

Druhou variantou je transformace 1,3,5-thiadiazinového cyklu na 1,3,5-triazin v přítomnosti hydrazinu za vzniku pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové struktury. Jako konkrétní příklad lze uvést transformaci 6-fenyl-2,4-dithio-6,8-dihydro-2*H*-pyrazolo[1,5-*c*]-1,3,5-thiadiazin-7(4*H*)-onu (**LXXXIV**) na 3-amino-6-fenyl-2,4-dithio-3,4,6,8-tetrahydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-7(2*H*)-on (**LXXXV**), která je uvedena na Obr. 57 (El-Saraf a kol., 2003).



Obr. 57: Schéma přípravy 3-amino-6-fenyl-2,4-dithioxo-3,4,6,8-tetrahydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-7(2H)-onu transformací 6-fenyl-2,4-dithioxo-6,8-dihydro-2H-pyrazolo[1,5-c]-1,3,5-thiadiazin-7(4H)-onu.

Třetí variantu pak představuje transformace 1,2,3-triazinového cyklu na cyklus pyrazolový (Gescher a kol., 1977; Stevens a kol., 1984). Zde lze uvést transformační reakci 2-imino-2H-benzo[e]-1,3,5-triazino[1,2-c]-1,2,3-triazin-4-aminů (**LXXXVI**), kdy za přítomnosti azidu sodného a kyseliny octové vznikají na 1,3,5-triazino[1,2-b]indazol-2,4-diaminové deriváty (**LXXIX**), (Stevens a kol., 1984). Reakční schéma je znázorněno na Obr. 58.



Obr. 58: Příprava 1,3,5-triazino[1,2-b]indazol-2,4-diaminů transformační reakcí 2-imino-2H-benzo[e]-1,3,5-triazino[1,2-c]-1,2,3-triazin-4-aminů.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál a metody

Pro hodnocení průběhu jednotlivých reakcí bylo využito metody tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách se silikagelem od společnosti Merck (60 WF 254). Desky s nanesenými vzorky byly vizualizovány prostřednictvím UV lampy (Camag) s vlnovými délkami 254 nm nebo 366 nm. Čištění některých reakčních produktů bylo provedeno kolonovou chromatografií s využitím silikagelu o velikosti částic 230 – 400 mesh a velikosti pórů 60 Å zakoupeného u firmy Sigma Aldrich. Pro odpaření rozpouštědel bylo použito rotačních vakuových odparek značky Heidolph Instruments. K vysušení některých produktů bylo využito sušárny značky Memmert (UF 55). Pro kontrolu hodnoty pH bylo využito indikátorových pH papírků pro pH 0 - 12 (Lach-ner).

Připravené látky byly analyzovány s využitím metody nukleární magnetické rezonance (NMR). Spektra byla získána při frekvenci 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) na přístroji JEOL 500 ECA (JEOL Ltd). Všechny vzorky byly před samotným měřením rozpuštěny v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO- $d_6$ ). Chemický posun je uveden v jednotkách ppm.

Hmotnostní spektra připravených látek byla získána s využitím hmotnostního spektrometru Q-TOF MICRO (Waters) pomocí pozitivní ionizace elektrosprejem. Identifikace dané látky byla vždy provedena podle dominantního iontu. Čistota připravených látek byla určena s využitím metody HPLC. Analýza proběhla na koloně s reverzní fází (150 mm x 2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Symmetry C18, Waters). Jednotlivé vzorky byly vždy rozpuštěny v dané mobilní fázi a následně nanoseny na kolonu. Eluce byla provedena lineárním gradientem (methanol/15mM mravenčan amonný, pH = 4) při průtoku 0,25 ml/min. Detekce snímání kladných iontů byla provedena ve *full scan* módu v rozsahu vlnových délek 50 – 1000 nm. Některé látky byly také analyzovány prostřednictvím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií na přístroji Shimadzu GC-MS QP 2010+, a to na koloně DB-5MS (Agilent, 30 m x 5  $\mu\text{m}$ ). Analýza proběhla elektronovou ionizací (*electron impact*) +70 eV s nastavením 60 °C, 15 °C/min, 280 °C (5 min). Měření probíhalo ve *splitless* režimu. Nástřik 1  $\mu\text{l}$  vzorku o koncentraci 1mg/ml byl proveden při teplotě 280 °C.

Použitá rozpouštědla byla zakoupena od firmy Lach-ner a Sigma Aldrich, ostatní chemikálie pak od firmy Fluka, Sigma Aldrich a VWR.

**Použité chemikálie:** cyklopentanon, kyanoctová kyselina, octan amonný, kyselina octová (AcOH), prášková měď (Cu), bezvodný síran sodný (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nasycený roztok chloridu sodného (NaCl), 10% palladium na aktivním uhlí (Pd-C), 2M diisopropylamid litný (LDA), ethylformiát, 5% roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO<sub>3</sub>), 80% hydrazin hydrát (NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O), 1M kyselina chlorovodíková (HCl), 1M hydroxid sodný (NaOH), ethoxykarbonyl isokyanát, ethoxykarbonyl isothiokyanát, *tert*-butoxid draselný ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COK), methyljodid (CH<sub>3</sub>I), dimethylsulfát ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), trichlorid fosforu (POCl<sub>3</sub>), fenylfosforoxydichlorid, triethylamin (TEA), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), 3-chlorperbenzoová kyselina, *trans*-1,4-diaminocyklohexan, 25% vodný roztok amoniaku (NH<sub>4</sub>OH), *N,N*-dimethylanilin (*N,N*-DMA), 4-brom-1*H*-pyrazol-3-amin, 4-(pyrrolidin-1-yl)anilin dihydrochlorid, uhličitan draselný (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>), ninhydrin, destilovaná voda, suchý led (CO<sub>2</sub>).

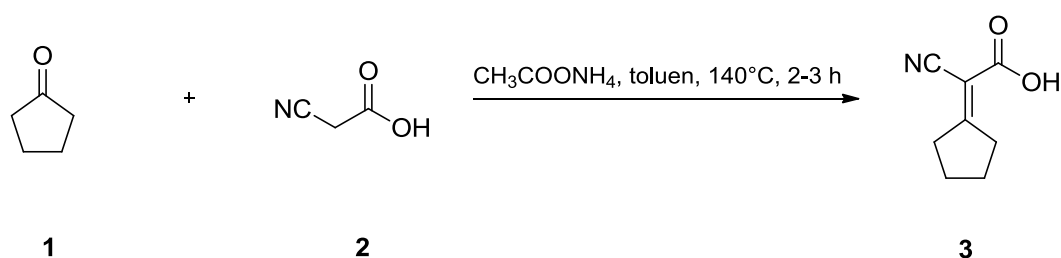
**Použitá rozpouštědla:** toluen, ethylenglykol, ethylacetát (EtOAc), methanol (MeOH), ethanol (EtOH), tetrahydrofuran (THF), dioxan, dimethylformamid (DMF), *tert*-butanol (*t*-butanol), methyl *tert*-butylether (MTBE), dichlormethan (DCM), *n*-propanol, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), hexan, deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO-*d*<sub>6</sub>).



## 3.2 Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů

### 3.2.1 Příprava 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu

#### 3.2.1.1 Příprava 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny (**3**), (Wan a kol., 1983; Sharma a Bhatia, 1989)

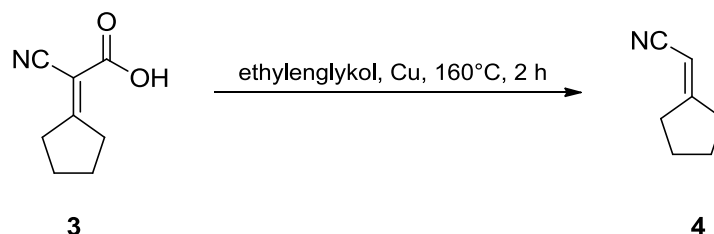


Obr. 59: Reakční schéma přípravy 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byly postupně přidány reaktanty: cyklopentanon (**1**) (126 mmol), kyanooctová kyselina (**2**) (126 mmol) a octan amonný (19 mmol). Následně byl k reakční směsi přidán toluen (80 ml). Baňka s reakční směsí byla umístěna do olejové lázně a k baňce byl připojen nástavec pro azeotropní destilaci. Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě  $140^\circ\text{C}$  po dobu 2 až 3 hodin. Během reakce bylo sledováno množství vyprodukované vody. Teoretická produkce vody činila 2,32 ml, skutečná produkce vody pak byla 2,30 ml. Po 2 až 3 hodinách, kdy se již neměnilo množství vyprodukované vody, byla reakce ukončena. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (toluen : dioxan : kyselina octová; 17:3:1).

Reakční směs se poté nechala zchladnout na laboratorní teplotu a následně byla umístěna do mrazáku ( $-5^\circ\text{C}$ ) na 30 minut. Po 30 minutách byly vyloučené krystaly zfiltrány pomocí frity a promyty vychlazeným toluenem (3 x 10 ml). Promyté krystaly byly z frity seškrábány do Petriho misky a zváženy. Mokrý produkt byl následně umístěn do sušárny, kde byl ponechán do následujícího dne při  $60^\circ\text{C}$ . Další den byl vysušený produkt opět zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.1.2 Příprava 2-cyklopentylideneacetonitrilu (4), (Grieco a Yokoyama, 1977)

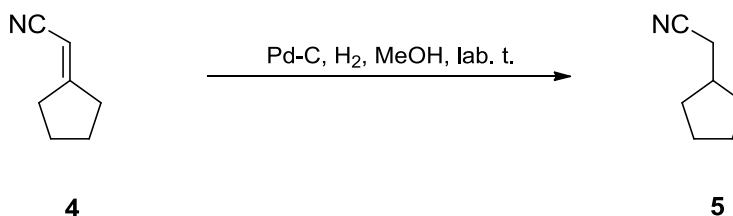


Obr. 60: Reakční schéma přípravy 2-cyklopentylideneacetonitrilu.

Do vysušené baňky byla přidána 2-kyano-2-cyklopentylidenoctová kyselina (3) (76,1 mmol), prášková měď (7,61 mmol) a ethylenglykol (70 ml). Reakční směs byla umístěna do olejové lázně a k baňce byl připojen chladič. Reakční směs se ponechala míchat při teplotě 160 °C po dobu 2 hodin. Po dvou hodinách byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (ethylacetát : hexan; 1:1; detekce manganistanem draselným). Reakční směs se poté ponechala zchladnout na laboratorní teplotu.

Dále byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu pomocí frity a promyta ethylacetátem (3 x 10 ml). K filtrátu byla přidána destilovaná voda (350 ml) a ethylacetát (150 ml). Organická fáze byla oddělena pomocí dělicí nálevky. Vodná fáze byla poté v dělicí nálevce protřepána s ethylacetátem (3 x 100 ml). Organické fáze byly spojeny dohromady, protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrovány pomocí frity. Rozpouštědlo bylo odpařeno s využitím rotační vakuové odpary. Vysušený a zvážený produkt byl použit do následující reakce.

### 3.2.1.3 Příprava 2-cyklopentylacetonitrilu (5), (Wan a kol., 1983; Park a kol., 1986)



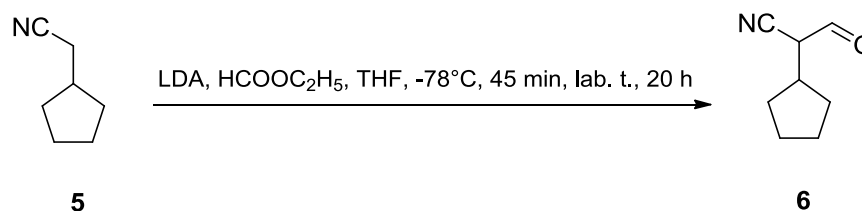
Obr. 61: Reakční schéma přípravy 2-cyklopentylacetonitrilu.

Do vysušené Erlenmeyerovy baňky byl přidán 2-cyklopentylideneacetonitril (4) (86,6 mmol) a methanol (150 ml). Reakční směs se na 5 minut ponechala promýt dusíkem. Poté bylo k reakční směsi přidáno 10% paladium na aktivním uhlí (1 mol %).

Reakční směs byla připojena k hydrogenační aparatuře. Hydrogenace probíhala za stálého míchání a její průběh byl kontrolován na základě spotřeby vodíku. Teoretická spotřeba vodíku činila 1,94 l, reálná spotřeba pak byla 2,12 l vodíku. Ve chvíli, kdy již nedocházelo k další spotřebě vodíku, byla reakce ukončena.

Po ukončení reakce a odpojení hydrogenační aparatury se reakční směs ponechala na 5 minut promýt dusíkem. Následně byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu s využitím frity a promyta methanolem (3 x 10 ml). Methanol byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Průběh reakce byl zhodnocen pomocí metody TLC (chloroform : methanol; 19:1; detekce manganistanem draselným). Produkt reakce byl zvážen a použit dále.

#### 3.2.1.4 Příprava 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitrilu (6), (WO 2015074135 A1)



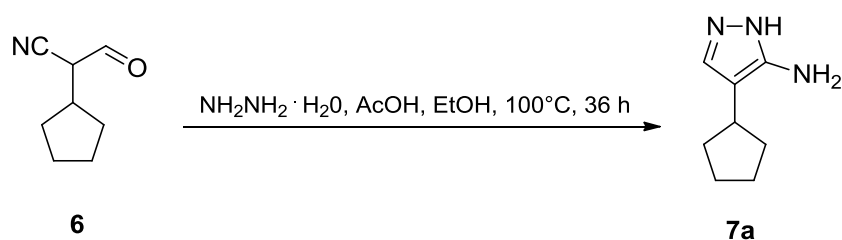
Obr. 62: Reakční schéma přípravy 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitrilu.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán tetrahydrofuran (100 ml). Baňka byla umístěna do chladicí lázně s ethanolem. Rozpouštědlo bylo s využitím suchého ledu ochlazeno na -78 °C a krátce promyto dusíkem. Teplota byla kontrolována pomocí rtuťového teploměru. Za stálého míchání byl do baňky postupně přidán 2M roztok diisopropylamidu litného (64,22 mmol). Reakční směs se ponechala míchat 20 minut při teplotě okolo -78 °C. K reakční směsi byl poté pomocí příkapávací nálevky postupně přidán 2-cyklopentylacetonitril (5) (47,56 mmol), který byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (50 ml). Reakční směs se ponechala míchat při teplotě -78 °C po dobu 20 minut. Následně byl k reakční směsi pomocí příkapávací 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 se ponechala za stálého míchání ohřát na laboratorní teplotu do následujícího dne.

Následující den byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (petrolether : ethylacetát; 3:1; detekce manganistanem draselným). Rozpouštědlo bylo z reakční směsi odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparku byl poté přidán

ethylacetát (100 ml). Roztok byl umístěn do chladicí lázně a ochlazen na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za stálého míchání a chlazení byl k roztoku postupně přidán 5% roztok hydrogenuhličitanu sodného (100 ml). Směs se ponechala míchat 20 minut při teplotě okolo  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně se oddělila organická fáze pomocí dělicí nálevky. Vodná fáze se poté protřepala ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze se promyly nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušily bezvodným síranem sodným a zfiltrovaly pomocí frity. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do následující reakce.

### 3.2.1.5 Příprava 4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-aminu (7a), (WO 2004022560 A1)



Obr. 63: Reakční schéma přípravy 4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-aminu.

Do vysušené baňky byl přidán 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitril (**6**) (54,0 mmol) a ethanol (30 ml). Roztok se nechal 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), směs se ponechala míchat 20 minut za laboratorní teploty. Následně byla do roztoku přidána kyselina octová (540,0 mmol) a reakční směs byla přelita do tlakové ampule. Reakční směs byla krátce promyta dusíkem a poté byla tlaková ampule umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala při teplotě  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 36 hodin.

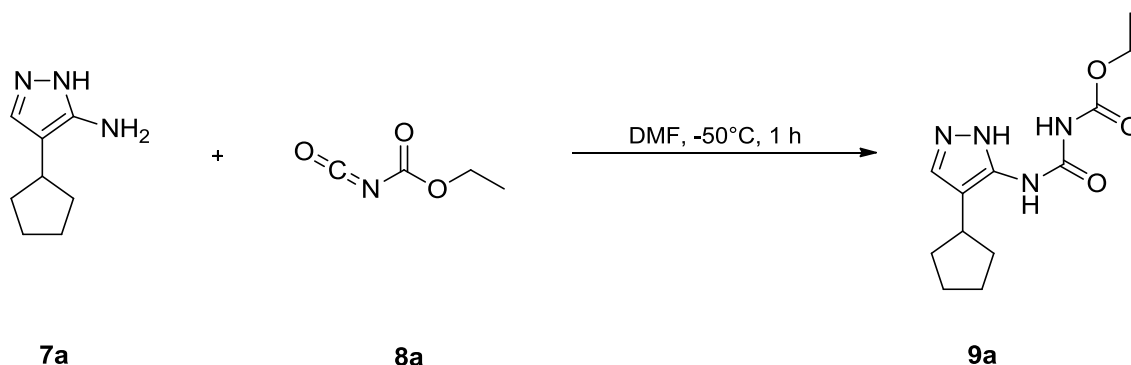
Po 36 hodinách byla reakce ukončena a její průběh byl zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1; detekce ninhydrinem). Poté co reakční směs zchladla na laboratorní teplotu, byla přelita do baňky a rozpouštědlo bylo pomocí rotační vakuové odparky odpařeno. K odparku byla přidána destilovaná voda (150 ml). Dále bylo potřeba zkontrolovat hodnotu pH pomocí indikátorových pH papírků, pH by mělo mít hodnotu 6 - 7. Po ujištění, že má roztok odpovídající hodnotu pH, byla reakční směs extrahována ethylacetátem (3 x 150 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem

sodným a zfiltrvány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen s využitím rotační vakuové odparky.

Následně bylo potřeba produkt přečistit od vedlejších produktů s využitím acidobazické extrakce. Produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu (100 ml). K roztoku byla přidána 1M kyselina chlorovodíková (100 ml) a pomocí indikátorových pH papírků bylo zkontrolováno pH, hodnota pH by neměla být vyšší než 2. Roztok se ponechal míchat 5 minut za laboratorní teploty. Poté se pomocí dělicí nálevky oddělila organická fáze. Vodná fáze byla protřepána ethylacetátem (1 x 100 ml), organická fáze se opět oddělila. Následně byla vodná fáze neutralizována přidavkem 1M hydroxidu sodného (110 ml) a byla zkontrolována hodnota pH. Hodnota pH by neměla být vyšší než 7. Vodná fáze byla dále opět extrahována ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly po extrakci protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrvány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen s využitím rotační vakuové odparky. Čistota produktu byla zkontrolována metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1; detekce ninhydrinem). Produkt byl poté dále čištěn pomocí kolonové chromatografie (silikagel; chloroform : methanol; 19:1;  $R_f$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH; 19:1) = 0,18). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a pomocí rotační vakuové odparky odpařeny. Vysušený produkt byl zvážen a použit do dalšího reakčního stupně.

### 3.2.2 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup A)

#### 3.2.2.1 Příprava ethylesteru kyseliny 4-(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)allofanové (9a)



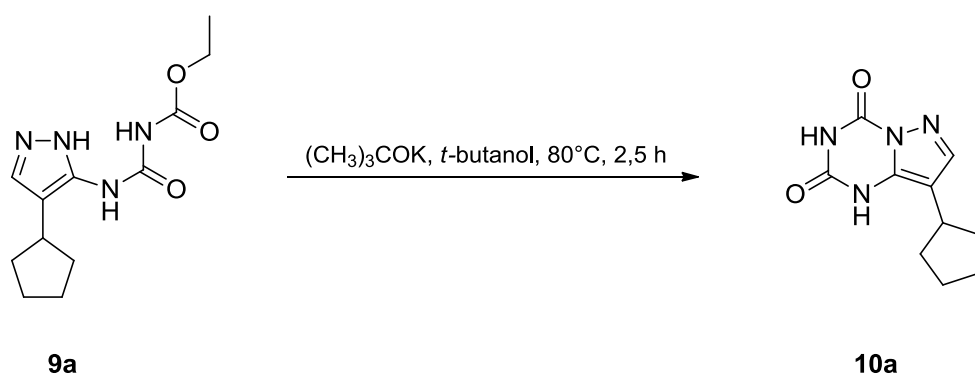
Obr. 64: Reakční schéma přípravy ethylesteru kyseliny 4-(4-cyklopentyl-1(2)*H*-pyrazol-5-yl)allofanové.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**7a**) (2,74 mmol) a suchý dimethylformamid (10 ml). Do baňky byl připevněn rtuťový teploměr. Baňka s roztokem byla následně umístěna do chladicí lázně s ethanolem. Za stálého míchání byla postupně pomocí suchého ledu teplota snížena na -50 °C. Poté byl k roztoku postupně pomalu přidán ethoxykarbonyl isokyanát (**8a**) (3,00 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě -50 °C po dobu jedné hodiny. Po jedné hodině byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1). Poté se reakční směs ponechala za stálého míchání ohřát na laboratorní teplotu.

K reakční směsi byla přidána destilovaná voda (25 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 x 25 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky.

Dále bylo potřeba požadovaný produkt oddělit od vedlejších reakčních produktů prostřednictvím krystalizace v ethylacetátu. K produktu v baňce byl přidán ethylacetát (10 ml). Směs byla umístěna do olejové lázně, k baňce byl připojen chladič a teplota byla za stálého míchání zvýšena na 80 °C. Po rozpuštění produktu se roztok ponechal míchat 20 minut za laboratorní teploty. Po 20 minutách byl roztok umístěn do chladicí lázně s ledem, kde se ponechal míchat do chvíle, kdy se v roztoku objevily pevné krystaly. Následně byl roztok se vzniklými krystaly zfiltrován pomocí frity. Krystaly byly promyty ethylacetátem (3 x 1 ml) a seškrábány do Petriho misky. Mokrý krystaly byly následně umístěny do sušárny, kde byly ponechány do následujícího dne při 60 °C. Další den byl vysušený produkt opět zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.2.2 Příprava 8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu (**10a**)



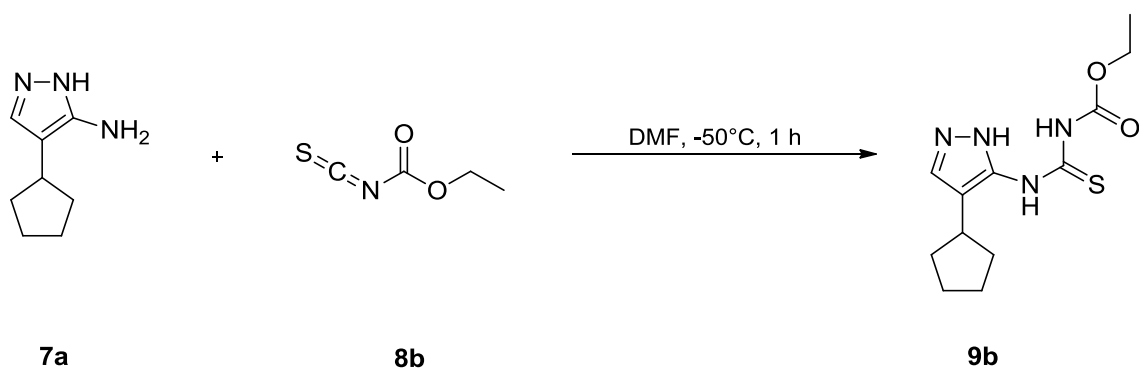
Obr. 65: Reakční schéma přípravy 8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu.

Do vysušené tlakové ampule byly postupně přidány reaktanty: ethylester kyseliny 4-(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)allofanové (**9a**) (0,38 mmol), *tert*-butoxid draselný (1,13 mmol) a *tert*-butanol (4 ml). Reakční aparatura byla inertizována dusíkem a uzavřená ampule byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala 2 a půl hodiny při 80 °C. Průběh reakce byl zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1) a poté byla reakce ukončena.

Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs přelita z tlakové ampule do baňky, rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparku byla přidána destilovaná voda (10 ml). Následně bylo potřeba zkontrolovat hodnotu pH pomocí indikátorových pH papírků a roztok neutralizovat přidávkem kyseliny octové (hodnota pH by měla být 6 – 7). Po neutralizaci se ve vodě vysrážel produkt ve formě bílých krystalů. Směs byla poté extrahována ethylacetátem (3 x 10 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a umístěn do lednice.

### 3.2.3 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B1)

#### 3.2.3.1 Příprava ethyl-*N*-[(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)karbamothioyl]karbamátu (**9b**)



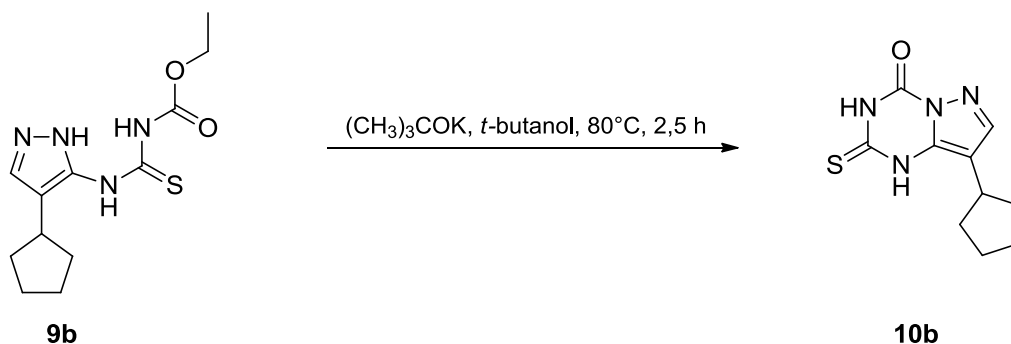
Obr. 66: Reakční schéma přípravy ethyl-*N*-[(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)karbamothioyl]karbamátu.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**7a**) (5,1 mmol) a suchý dimethylformamid (15 ml). Do baňky byl upevněn rtuťový teploměr. Baňka byla umístěna do chladicí lázně s ethanolem. Teplota byla za stálého

míchání snížena pomocí suchého ledu na  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byl k roztoku postupně pomalu přidán ethoxykarbonyl isothiokyanát (**8b**) (5,6 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Poté byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1), reakce byla ukončena a reakční směs se ponechala za stálého míchání pozvolna ohřát na laboratorní teplotu.

Poté byla k reakční směsi přidána destilovaná voda (40 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 x 40 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Následně bylo potřeba surový produkt přečistit pomocí kolonové chromatografie (silikagel; chloroform : methanol; 19:1;  $R_f$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH; 19:1) = 0,42). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a odpařeny pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.3.2 Příprava 8-cyklopentyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-onu (**10b**)



Obr. 67: Reakční schéma přípravy 8-cyklopentyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-onu.

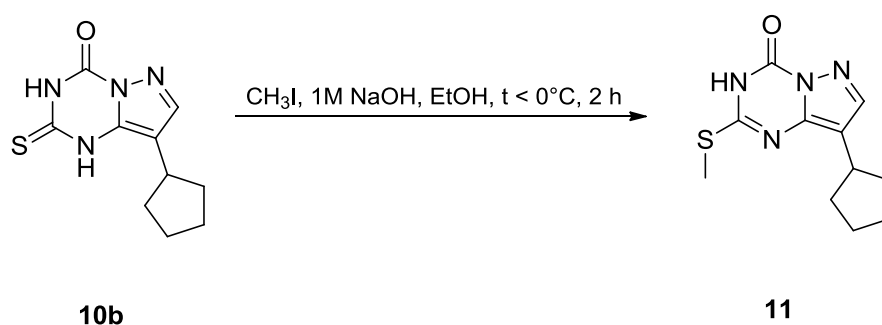
Do vysušené tlakové ampule byly přidány reaktanty: ethyl-*N*-[(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)karbamothioyl]karbamát (**9b**) (2,39 mmol), *tert*-butoxid draselný (7,16 mmol) a *tert*-butanol (25 ml). Reakční aparatura byla inertizována dusíkem a uzavřená ampule byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala za stálého míchání 2 a půl hodiny při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Průběh reakce byl zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1) a poté byla reakce ukončena.

Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs přelita z tlakové ampule do baňky, rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparku byla přidána destilovaná voda (100 ml). Následně bylo potřeba zkontrolovat hodnotu



pH pomocí indikátorových pH papírků a roztok neutralizovat přidavkem kyseliny octové (hodnota pH by měla být 6 – 7). Po neutralizaci se ve vodě vysrážel produkt ve formě bílých krystalů. Směs byla poté extrahována ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.3.3 Příprava 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-onu (11)



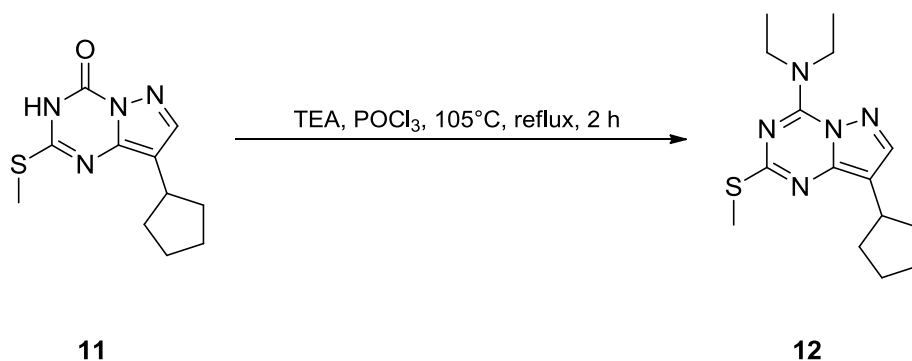
Obr. 68: Reakční schéma přípravy 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-onu.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán 8-cyklopentyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-on (**10b**) (1,27 mmol) a rozpuštěn v ethanolu (20 ml). K roztoku byl poté přidán 1M NaOH (3,81 mmol). Do baňky byl upevněn rtuťový teploměr. Baňka s reakční směsí byla umístěna do chladicí lázně s ethanolem. Teplota byla pomocí suchého ledu za stálého míchání snížena pod 0 °C. Následně byl k reakční směsí postupně přidán methyljodid (5,08 mmol). Teplota byla udržována pod 0 °C. Průběh reakce byl průběžně kontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1). Po 2 hodinách bylo ukončeno chlazení a reakční směs se nechala za stálého míchání pozvolna ohřát na laboratorní teplotu.

Následně bylo rozpouštědlo z reakční směsí odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparky byla přidána destilovaná voda (100 ml) a pomocí indikátorových pH papírků byla zkontrolována hodnota pH, pH by se mělo pohybovat v rozmezí 6 – 7. Poté byl vodný roztok extrahován ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem

sodným a zfiltrvány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

#### 3.2.3.4 Příprava 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (**12**)

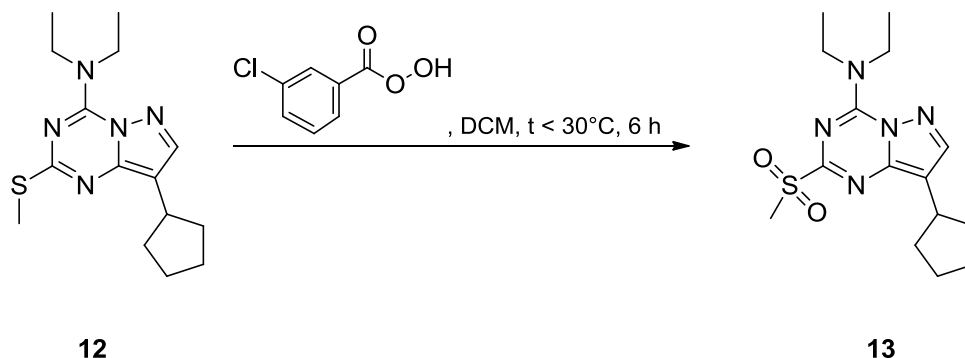


Obr. 69: Reakční schéma přípravy 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu

Do vysušené baňky byl přidán 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-on (**11**) (1,2 mmol), k němu byl následně přidán trichlorid fosforylu (30,0 mmol) a triethylamin (6,0 mmol). Baňka s reakční směsí byla umístěna do olejové lázně a připevněna k chladiči. Reakce probíhala při teplotě 105 °C po dobu 2 hodin. Po 2 hodinách byla baňka s reakční směsí z lázně vytažena a ponechala se ochladit na laboratorní teplotu mimo lázeň. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1).

Reakční směs byla poté pomalu přelita do kádinky se zmrzlou destilovanou vodou a ponechala se 20 minut intenzivně míchat. Směs byla následně extrahována methyl *tert*-butyletherem (3 x 50 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrvány pomocí frity. Methyl *tert*-butylether byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.3.5 Příprava 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (13)

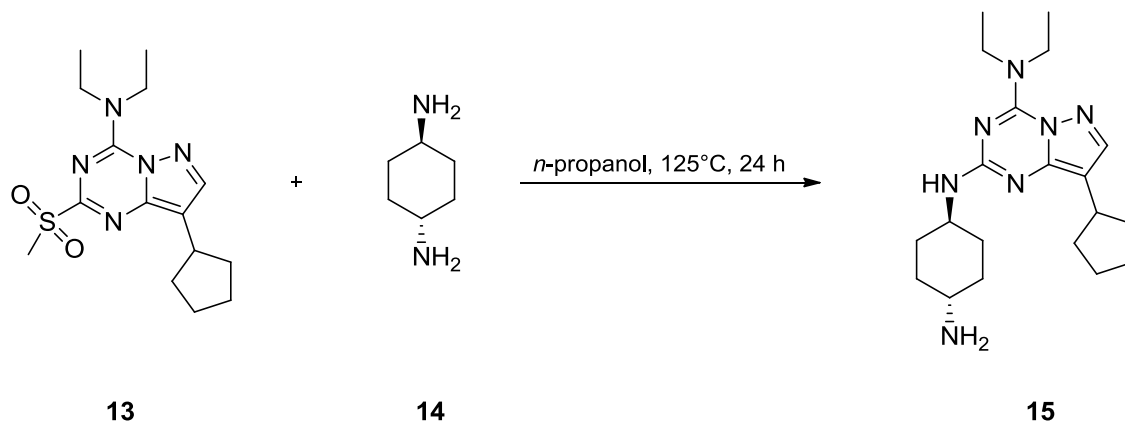


Obr. 70: Reakční schéma přípravy 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu.

Do vysušené baňky byl přidán 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**12**) (0,944 mmol) a rozpuštěn v dichlormethanu (9 ml). Baňka byla poté upevněna do kádinky s vychlazenou vodou. Za stálého míchání byla k roztoku postupně přidána 3-chlorperbenzoová kyselina (2,83 mmol). Reakční směs se poté ponechala míchat za laboratorní teploty po dobu 6 hodin. Průběh reakce byl kontrolován metodou TLC (dichlormethan). Po 6 hodinách byla reakce ukončena.

Reakční směs byla dále zfiltrována pomocí frity a promyta dichlormethanem (3 x 5 ml). K filtrátu byl přidán 5% roztok hydrogenuhličitanu sodného (20 ml). Organická fáze byla oddělena pomocí dělicí nálevky, protřepána s destilovanou vodou (20 ml) a následně také s nasyceným roztokem chloridu sodného. Poté byla organická fáze vysušena bezvodným síranem sodným a zfiltrována přes fritu. Dichlormethan byl odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a použit do následující reakce.

## 3.2.3.6 Příprava

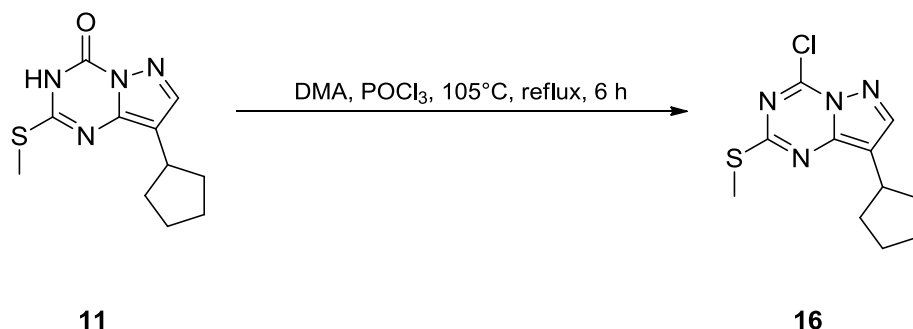
 $N^2$ -((1*r*, 4*r*)-4-aminocyklohexyl)-8-cyklopentyl- $N^4, N^4$ -diethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-diaminu (**15**)

Obr. 71: Reakční schéma přípravy  $N^2$ -((1*r*, 4*r*)-4-aminocyklohexyl)-8-cyklopentyl- $N^4, N^4$ -diethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-diaminu.

Do vysušené tlakové ampule byly postupně přidány reaktanty: 8-cyklopentyl- $N, N$ -diethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**13**) (0,59 mmol), *trans*-1,4-diaminocyklohexan (**14**) (2,36 mmol) a *n*-propanol (6 ml). Reakční aparatura byla inertizována dusíkem a uzavřená tlaková ampule byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě 125 °C 24 hodin.

Následující den byl průběh reakce zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 4:1). Poté byla ampule s reakční směsí z olejové lázně vytažena a reakční směs se nechala pozvolna zchladnout na laboratorní teplotu. Reakční směs byla následně přelita do baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odpary. K odparku byla přidána destilovaná voda (20 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 x 20 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen s využitím rotační vakuové odpary. Následně bylo potřeba surový produkt přečistit pomocí kolonové chromatografie (silikagel; chloroform : methanol : 25% vodný roztok amoniaku; 4:1:0,05;  $R_f$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH : NH<sub>4</sub>OH; 4:1:0,05) = 0,18). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a pomocí rotační vakuové odpary odpařeny. Vysušený produkt byl zvážen a uložen do lednice.

### 3.2.3.7 Příprava 4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu (16)



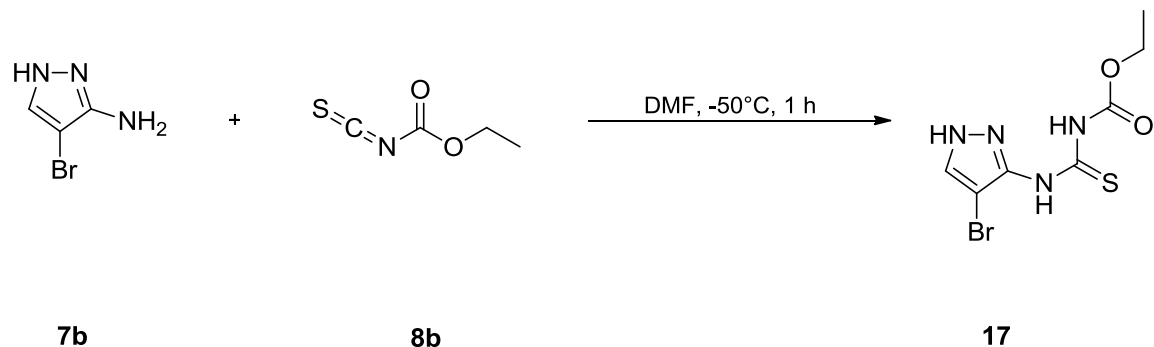
Obr. 72: Reakční schéma 4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu.

Do vysušené baňky byl přidán 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-on (**11**) (2,24 mmol), k němu byl následně přidán trichlorid fosforylu (67,2 mmol) a *N,N*-dimethylanilin (3,36 mmol). Baňka s reakční směsí byla umístěna do olejové lázně a připevněna k chladiči. Reakce probíhala při teplotě 105 °C po dobu 6 hodin. Po 6 hodinách byla baňka s reakční směsí z lázně vytažena a ponechala se ochladit na laboratorní teplotu mimo lázeň. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1).

Dále byl z reakční směsi odpařen trichlorid fosforylu pomocí rotační vakuové odparky. Poté byla reakční směs prodestilována s toluenem (20 ml). K odparku byla následně přidána destilovaná voda (20 ml) a směs byla extrahována toluenem (3 x 20 ml). Následně byla provedena kontrola pH spojených organických fází (pH = 2). Spojené organické fáze byly protřepány 5% hydrogenuhličitanem sodným, poté nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Rozpouštědlo bylo odpařeno s využitím rotační vakuové odparky. Následně bylo potřeba surový produkt přečistit pomocí kolonové chromatografie (silikagel; dichlormethan : hexan; 1:1;  $R_f$  (DCM : HEXAN; 1:1) = 0,19). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a pomocí rotační vakuové odparky odpařeny. Vysušený produkt byl zvážen a uložen do lednice.

### 3.2.4 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B2)

#### 3.2.4.1 Příprava ethyl-*N*-[(4-brom-1(2)*H*-pyrazol-3-yl)karbamothioyl]karbamátu (17), (Cabon a kol., 2003)

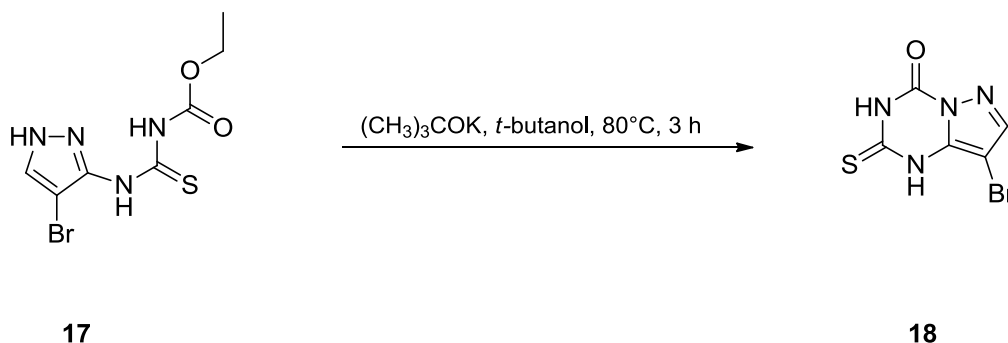


Obr. 73: Reakční schéma přípravy ethyl-*N*-[(4-brom-1(2)*H*-pyrazol-3-yl)karbamothioyl]karbamátu.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán 4-brom-1*H*-pyrazol-3-amin (**7b**) (6,25 mmol) a suchý dimethylformamid (10 ml). Do baňky byl upevněn rtuťový teploměr. Baňka byla umístěna do chladicí lázně s ethanolem. Teplota byla za stálého míchání snížena pomocí suchého ledu na -50 °C. Následně byl k roztoku postupně pomalu přidán ethoxykarbonyl isothiokyanát (**8b**) (6,88 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při -50 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl průběh reakce zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1), reakce byla ukončena a reakční směs se ponechala za stálého míchání pozvolna ohřát na laboratorní teplotu.

Poté byla k reakční směsi přidána destilovaná voda (75 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 x 75 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen s využitím rotační vakuové odpary. Následně bylo potřeba surový produkt přečistit pomocí kolonové chromatografie (silikagel; chloroform : methanol; 19:1;  $R_f$  (CHCl<sub>3</sub> : MeOH; 19:1) = 0,42). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a odpařeny pomocí rotační vakuové odpary. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.4.2 Příprava 8-brom-2-thio-1,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-onu (**18**), (Sun a kol., 2013a).

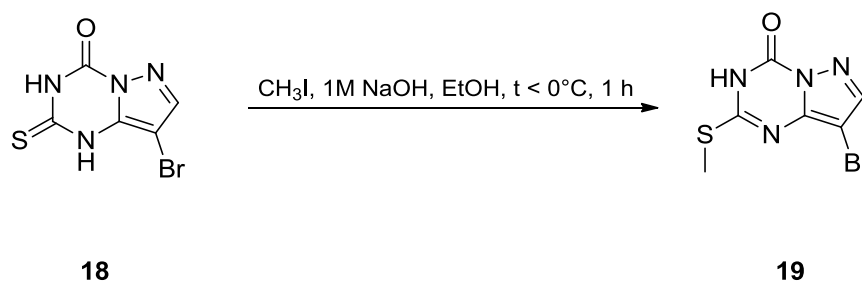


Obr. 74: Reakční schéma přípravy 8-brom-2-thio-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-onu.

Do vysušené tlakové ampule byly přidány reaktanty: ethyl-*N*-[(4-brom-1*H*-pyrazol-3-yl)karbamothioyl]karbamát (**17**) (4,36 mmol), *tert*-butoxid draselný (13,1 mmol) a *tert*-butanol (50 ml). Reakční aparatura byla inertizována dusíkem a uzavřená ampule byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala za stálého míchání 3 hodiny při  $80^\circ\text{C}$ . Průběh reakce byl zkontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1) a poté byla reakce ukončena.

Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs přelita z tlakové ampule do baňky, rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparku byla přidána destilovaná voda (60 ml). Následně bylo potřeba zkontrolovat hodnotu pH pomocí indikátorových pH papírků a roztok neutralizovat přidávkem 1M kyseliny chlorovodíkové (hodnota pH by měla být 5 – 6). Po neutralizaci se ve vodě vysrážel produkt ve formě bílých krystalů. Směs s pevným podílem byla poté zfiltrována přes fritu a promyta destilovanou vodou (3 x 5 ml). Krystaly byly z frity seškrabány do baňky a uloženy na 24 hodin do exsikátoru. Vysušený produkt byl zvážen a použit do další reakce.

### 3.2.4.3 Příprava 8-brom-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-onu (19), (Kobe a kol., 1974)



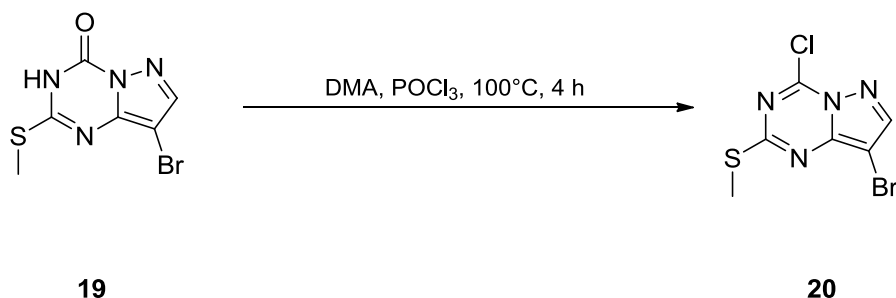
Obr. 75: Reakční schéma přípravy 8-brom-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-onu.

Do vysušené dvojhrdlé baňky byl přidán 8-brom-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(1H)-on (**18**) (3,4 mmol) a rozpuštěn v ethanolu (50 ml). K roztoku byl poté přidán 1M hydroxid sodný (17,0 mmol). Do baňky byl upevněn rtuťový teploměr. Baňka s reakční směsí byla umístěna do chladicí lázně s ethanolom. Teplota byla pomocí suchého ledu za stálého míchání snížena pod 0 °C. Následně byl k reakční směsí postupně přidán methyljodid (5,1 mmol). Teplota byla udržována pod 0 °C. Průběh reakce byl průběžně kontrolován metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1). Po 1 hodině bylo ukončeno chlazení a reakční směs se nechala za stálého míchání pozvolna ohřát na laboratorní teplotu.

Následně bylo rozpouštědlo z reakční směsí odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. K odparky byla přidána destilovaná voda (75 ml) a pomocí indikátorových pH papírků byla zkontrolována hodnota pH. Vodný roztok byl poté neutralizován přidávkem 1M kyseliny chlorovodíkové, pH by se mělo pohybovat v rozmezí 5 – 6. Po neutralizaci se ve vodě vysrážel produkt ve formě bílých krystalů. Směs s pevným podílem byla poté zfiltrována přes Büchnerovu nálevku a promyta destilovanou vodou (3 x 5 ml). Krystaly byly z frity seškrabány do baňky a uloženy na 24 hodin do exsikatoru. Vysušený produkt byl zvážěn a použit do další reakce.



#### 3.2.4.4 Příprava 8-brom-4-chlor-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu (**20**), (Kobe a kol., 1974)

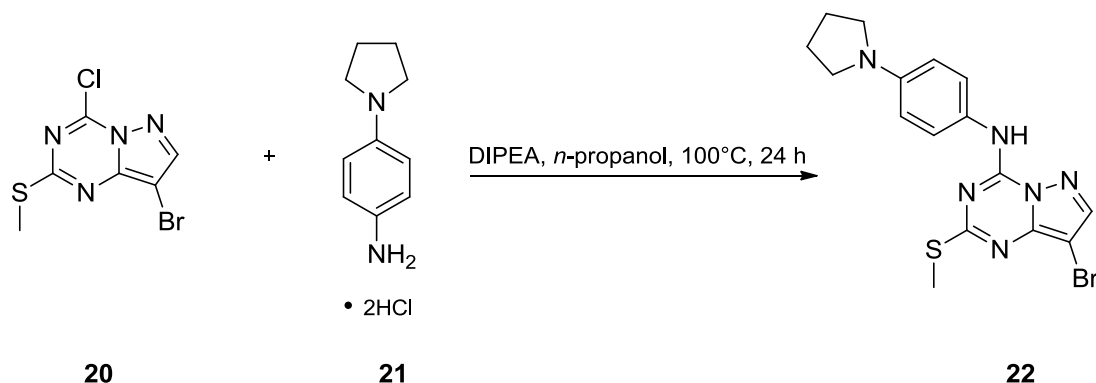


Obr. 76: Reakční schéma přípravy 8-brom-4-chlor-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu.

Do vysušené tlakové ampule byl přidán 8-brom-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-on (**19**) (1,92 mmol), k němu byl následně přidán trichlorid fosforu (57,6 mmol) a *N,N*-dimethylanilin (2,87 mmol). Uzavřená ampule s reakční směsí byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala při teplotě 100 °C po dobu 4 hodin. Po 4 hodinách byla ampule s reakční směsí z lázně vytažena a ponechala se ochladit na laboratorní teplotu mimo lázeň. Průběh reakce byl zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1).

Dále byl z reakční směsi odpařen trichlorid fosforu pomocí rotační vakuové odparky. Poté byla reakční směs prodestilována s toluenem (20 ml). K odparku byla přidána destilovaná voda (20 ml) a směs byla extrahována toluenem (3 x 20 ml). Následně byla provedena kontrola pH spojených organických fází (pH = 2). Spojené organické fáze byly protřepány 5% hydrogenuhličitanem sodným (20 ml), poté nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Rozpouštědlo bylo odpařeno s využitím rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a uložen do lednice.

### 3.2.4.5 Příprava 8-brom-2-(methylthio)-*N*-(4-(pyrrolidin-1-yl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (**22**)



Obr. 77: Reakční schéma přípravy 8-brom-2-(methylthio)-*N*-(4-(pyrrolidin-1-yl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu.

Do vysušené tlakové ampule byly postupně přidány reaktanty: 8-brom-4-chlor-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**20**) (0,95 mmol), 4-(pyrrolidin-1-yl)anilin dihydrochlorid (**21**) (1,00 mmol), dále *n*-propanol (4 ml) a následně *N,N*-diisopropylethylamin (4,75 mmol). Reakční aparatura byla inertizována dusíkem a uzavřená tlaková ampule byla umístěna do olejové lázně. Reakce probíhala za stálého míchání při teplotě 100 °C 24 hodin.

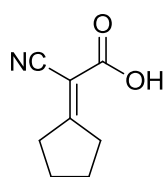
Následující den byl průběh reakce zhodnocen metodou TLC (chloroform : methanol; 19:1). Poté byla ampule s reakční směsí z olejové lázně vytažena a reakční směs se nechala pozvolna zchladnout na laboratorní teplotu. Reakční směs byla následně přelita do baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. K odparku byla přidána destilovaná voda (20 ml) a směs byla extrahována ethylacetátem (3 x 20 ml). Spojené organické fáze byly protřepány nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodným síranem sodným a zfiltrány pomocí frity. Ethylacetát byl odpařen s využitím rotační vakuové odparky. Následně bylo potřeba produkt přechistit pomocí kolonové chromatografie (silikagel; chloroform;  $R_f(\text{CHCl}_3) = 0,65$ ). Frakce obsahující požadovaný produkt byly slity dohromady a odpařeny pomocí rotační vakuové odparky. Vysušený produkt byl zvážen a uložen do lednice.

### 3.3 Výsledky

#### 3.3.1 Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů

Na základě reakčních postupů uvedených v rámci kapitoly 3.2 byly připraveny jednak látky vedoucí k syntéze pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (**3** – **6**, **7a**, **9a**, **9b**, **17**) a dále pak také samotné pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty (**10a**, **10b**, **11** – **16**, **18** – **20**, **22**).

#### 2-kyano-2-cyklopentylidenoctová kyselina (**3**)



**Výtěžek:** 50 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>.

**Relativní molekulová hmotnost:** 151,16.

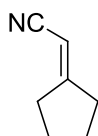
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,64 – 1,74 (m, 4H); 2,65 – 2,68 (m, 2H); 2,83 – 2,86 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 25,15; 26,59; 35,51; 37,67; 101,82; 116,97; 163,62; 186,48.

**MS** (ESI+; *m/z*): 152,10 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 100 %.

#### 2-cyklopentylideneacetonitril (**4**)



**Výtěžek:** 85 %.

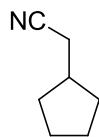
**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N.

**Relativní molekulová hmotnost:** 107,15.

**GC-MS:** *m/z* (rel. int.): 67,00 (100); 107,00 (24); 78,95 (18); 65,95 (12); 76,95 (10). R<sub>t</sub>: 4,79.

*Pozn.: U látky nedochází k ionizaci, a nelze ji tak charakterizovat prostřednictvím metody HPLC-ESI-MS.*

## 2-cyklopentylacetonitril (5)



**Výtěžek:** 82 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N.

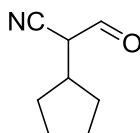
**Relativní molekulová hmotnost:** 109,17.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,14 – 1,22 (m, 2H); 1,43 – 1,52 (m, 2H); 1,53 – 1,62 (m, 2H); 1,71 – 1,77 (m, 2H); 2,068 (sep, *J* = 7,0 Hz, 1H); 2,48 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 22,16; 25,12; 31,97; 36,16; 63,2; 120,69.

*Pozn.: U látky nedochází k ionizaci, a nelze ji tak charakterizovat prostřednictvím metody HPLC-ESI-MS.*

## 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitril (6)



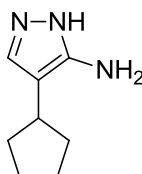
**Výtěžek:** 83 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO.

**Relativní molekulová hmotnost:** 137,18.

*Pozn.: Látka byla vzhledem k nízké stabilitě ihned použita do další reakce a kromě TLC metody nebyla dále charakterizována.*

## 4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-amin (7a)



**Výtěžek:** 91 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>.

**Relativní molekulová hmotnost:** 151,21.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,28 – 1,35 (m, NH, CH<sub>2</sub>); 1,46 – 1,55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,59 – 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,83 – 1,90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,62 – 2,71 (m, 1H, CH); 4,23 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>); 7,05, 7,06 (s, 1H, ArH).

**MS** (ESI+; *m/z*): 152,32 [M+H<sup>+</sup>].

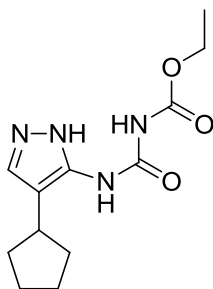
**HPLC čistota:** 98 %.

**Elementární analýza C, H, N:**

Teoreticky vypočteno: C, 63,54; H, 8,67; N, 27,79.

Nalezeno: C, 62,33; H, 8,80; N, 25,18.

**ethylester kyseliny 4-(4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-yl)allofanové (9a)**



**Výtěžek:** kvant.

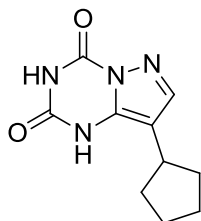
**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>.

**Relativní molekulová hmotnost:** 266,30.

**MS (ESI+; m/z):** 267,67 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 99 %.

**8-cyklopentylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-2,4(1H,3H)-dion (10a)**



**Výtěžek:** 82 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.

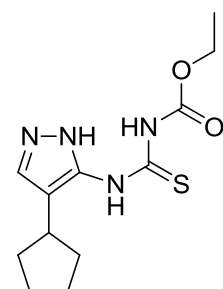
**Relativní molekulová hmotnost:** 220,23.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,39 – 1,44 (m, 2H); 1,52 – 1,58 (m, 2H); 1,64 – 1,73 (m, 2H); 1,84 – 1,90 (m, 2H); 3,10 (qui, *J* = 6,5 Hz, 1H, CH); 7,81 (s, 1H); 10,25 (s, 1H, NH); 11,80 (s, 1H, NH).

**MS (ESI+; m/z):** 221,45 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 100 %.

**ethyl-N-[(4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-yl)karbamothioyl]karbamát (9b)**



**Výtěžek:** kvant.

**Sumární vzorec:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 282,36.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,21 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,32 – 1,39 (m, 2H); 1,47 – 1,53

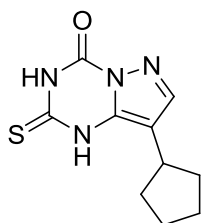
(m, 2H); 1,57 – 1,64 (m, 2H); 1,85 – 1,91 (m, 2H); 2,77 (qui,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 4,17 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 7,48 (s, 1H); 7,91 (s, 1H); 10,93 (s, 1H); 11,29 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 14,36; 25,03; 31,23; 33,65; 35,10; 36,24; 49,23; 62,84; 154,21; 162,86; 181,26; 207,11.

MS (ESI+;  $m/z$ ): 283,53 [M+H<sup>+</sup>].

HPLC čistota: 97 %.

### 8-cyklopentyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-on (10b)



Výtěžek: 96 %.

Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>OS.

Relativní molekulová hmotnost: 236,29.

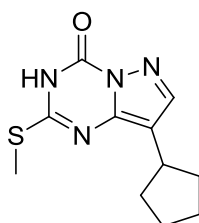
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,37 – 1,46 (m, 2H); 1,49 – 1,58 (m, 2H); 1,66 – 1,73 (m, 2H); 1,84 – 1,90 (m, 2H); 3,11 (dq,  $J = 7,0$  Hz,  $J' = 2,0$  Hz, 1H); 3,31 (s, 1H); 7,85 (s, 1H); 12,58 (s, 1H); 13,33 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 25,20; 32,71; 34,0; 108,67; 137,02; 142,07; 144,91; 173,46.

MS (ESI+;  $m/z$ ): 237,46 [M+H<sup>+</sup>].

HPLC čistota: 99 %.

### 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-on (11)



Výtěžek: 97 %.

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>OS.

Relativní molekulová hmotnost: 250,32.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,56 – 1,63 (m, 4H); 1,68 – 1,75 (m, 2H); 1,94 – 1,99 (m, 2H); 2,5 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3,01 (qui,  $J = 8,0$  Hz, 1H); 7,88 (s, 1H); 12,69 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 13,5; 25,31; 33,69; 34,59; 115,31; 144,09; 144,95; 145,41; 155,53.

**MS** (ESI+; m/z): 251,38 [M+H<sup>+</sup>].

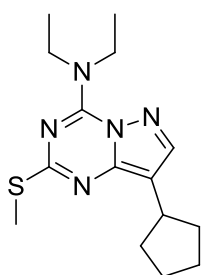
**HPLC čistota:** 85 %.

**Elementární analýza C, H, N:**

Teoreticky vypočteno: C, 52,78; H, 5,64; N, 22,38.

Nalezeno: C, 53,54; H, 5,94; N, 19,53.

### 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (12)



**Výtěžek:** 89 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 305,44.

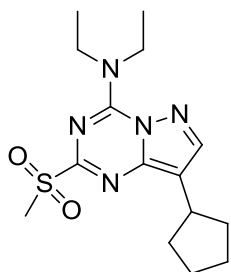
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 0,45 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>); 0,78 – 0,88 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 0,92 – 0,98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,14 – 1,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,71 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 2,27 (qui, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH); 7,15 (s, 1H, CH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,28; 24,47; 25,18; 32,86; 33,70; 44,29; 109,90; 143,33; 147,09; 147,51; 163,89.

**MS** (ESI+; m/z): 306,58 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 58 %.

### 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (13)



**Výtěžek:** 69 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 337,44.

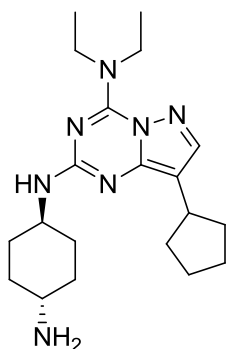
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,57 – 1,66 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 1,69 – 1,77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,95 – 2,01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,12 (qui, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH); 3,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 8,20 (s, 1H, CH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 25,21; 29,51; 33,88; 34,41; 115,63; 145,30; 146,81; 149,74; 158,95.

MS (ESI+; m/z): 338,53 [M+H<sup>+</sup>].

HPLC čistota: 89 %.

***N*<sup>2</sup>-((1*r*, 4*r*)-4-aminocyklohexyl)-8-cyklopentyl-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-diethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4-diamin (15)**



Výtěžek: 91 %.

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>.

Relativní molekulová hmotnost: 371,52.

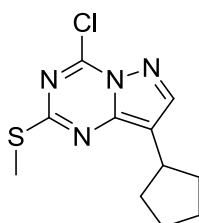
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,18 (t, *J* = 6,5 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>); 1,23 – 1,36 (m, 4H); 1,50 – 1,62 (m, 4H); 1,65 – 1,73 (m, 2H); 1,78 – 1,88 (m, 2H); 1,91 – 1,97 (m, 4H); 2,325 (qui, *J* = 7,0 Hz, 1H, CH); 2,86 (q, *J* = 6,5 Hz, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 3,53 – 3,59 (m, 1H); 3,86 (s (br) 2H, NH<sub>2</sub>); 7,64 (s, 1H, CH).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 14,32; 25,02; 25,54; 30,42; 31,16; 33,36; 34,78; 42,21; 49,20; 89,39; 100,57; 107,36; 144,00; 149,16.

MS (ESI+; m/z): 372,78 [M+H<sup>+</sup>].

HPLC čistota: 94 %.

**4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (16)**



Výtěžek: kvant.

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>S.

Relativní molekulová hmotnost: 268,77.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,51 – 1,62 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>); 1,68 – 1,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,88 – 1,99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 7,87 (s, 1H, CH); 2,96 (qui, *J* = 7,0 Hz, 1H, CH).

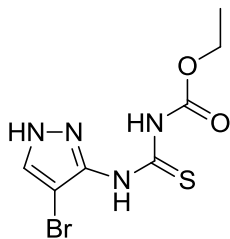
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 14,08; 25,20; 33,62; 34,55; 126,60; 129,38; 130,14; 144,12; 145,36.

MS (ESI+; m/z): 269,37 [M+H<sup>+</sup>].



**HPLC čistota:** 17 %.

**ethyl-*N*-[(4-brom-1*H*-pyrazol-3-yl)karbamothioyl]karbamát (17)**



**Výtěžek:** 71 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 293,14.

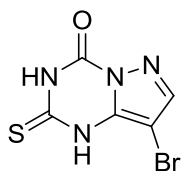
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H); 4,18 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H); 7,96 (s, 1H); 10,92 (s, 1H, NH); 11,42 (s, 1H, NH); 13,10 (s (br), 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 14,66; 62,72; 91,20; 130,99; 145,04; 154,14.

**MS** (ESI+; *m/z*): 293,40 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 98 %.

**8-brom-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-on (18)**



**Výtěžek:** 78 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>BrN<sub>4</sub>OS.

**Relativní molekulová hmotnost:** 247,07.

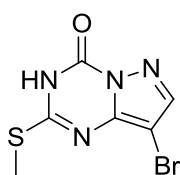
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7,96 (s, 1H); 12,78 (s, 1H); 13,73 (s (br), 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 75,43; 139,39; 141,46; 146,16; 174,34.

**MS** (ESI+; *m/z*): 249,30 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 99 %.

**8-brom-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-on (19)**



**Výtěžek:** 80 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>BrN<sub>4</sub>OS.

**Relativní molekulová hmotnost:** 261,10.

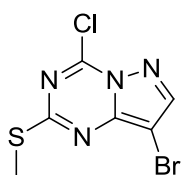
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,53 (s, 3H); 8,08 (s, 1H); 13,05 (s (br) 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,59; 84,23; 143,58; 145,97; 146,23; 159,32.

**MS** (ESI+; *m/z*): 261,32 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 100 %.

### 8-brom-4-chlor-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (20)



**Výtěžek:** kvant.

**Sumární vzorec:** C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>BrClN<sub>4</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 279,54.

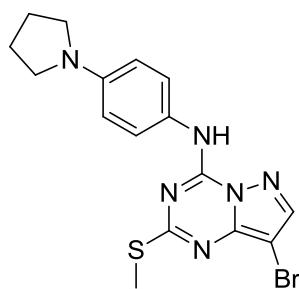
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,53 (s, 3H); 8,08 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 13,53; 84,27; 143,41; 145,98; 146,20; 159,16.

**MS** (ESI+; *m/z*): 281,38 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 42 %.

### 8-brom-2-(methylthio)-*N*-(4-(pyrrolidin-1-yl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (22)



**Výtěžek:** 86 %.

**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>BrN<sub>6</sub>S.

**Relativní molekulová hmotnost:** 405,32.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,91 – 1,94 (m, 4H); 3,18 – 3,21 (m, 2H); 3,30 (s, 3H); 6,52 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H); 7,44 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H); 8,24 (s, 1H); 10,51 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 14,28; 25,52; 47,95; 81,05; 111,70; 120,39; 125,37; 145,23; 146,32; 146,51; 161,56; 168,38.

**MS** (ESI+; *m/z*): 407,73 [M+H<sup>+</sup>].

**HPLC čistota:** 99 %.

### 3.3.2 Biologická aktivita vybraných derivátů

Připravené pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty **15** a **22** byly předány pracovníci Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., která provedla testy inhibiční a antiproliferační aktivity. Experimenty byly provedeny dle Gucký a kol., 2013. Já osobně jsem se na testování vzorků nepodílel. Konkrétně byla otestována jejich inhibiční aktivita vůči kináze CDK2. Testy antiproliferační aktivity byly provedeny na buněčných liniích K562 (chronická myeloidní leukémie) a MCF-7 (rakovina prsu). Výsledky shrnuje Tab. 8.

*Tab. 8: Inhibiční aktivita vůči CDK2 a in vitro antiproliferační aktivita vybraných pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů 15 a 22.*

derivát	IC <sub>50</sub> (CDK2) [μM]	GI <sub>50</sub> (K562) [μM]	GI <sub>50</sub> (MCF-7) [μM]
<b>15</b>	0,5	4,4	6,5
<b>22</b>	1,1	>12,5	>12,5

## 4 Diskuze

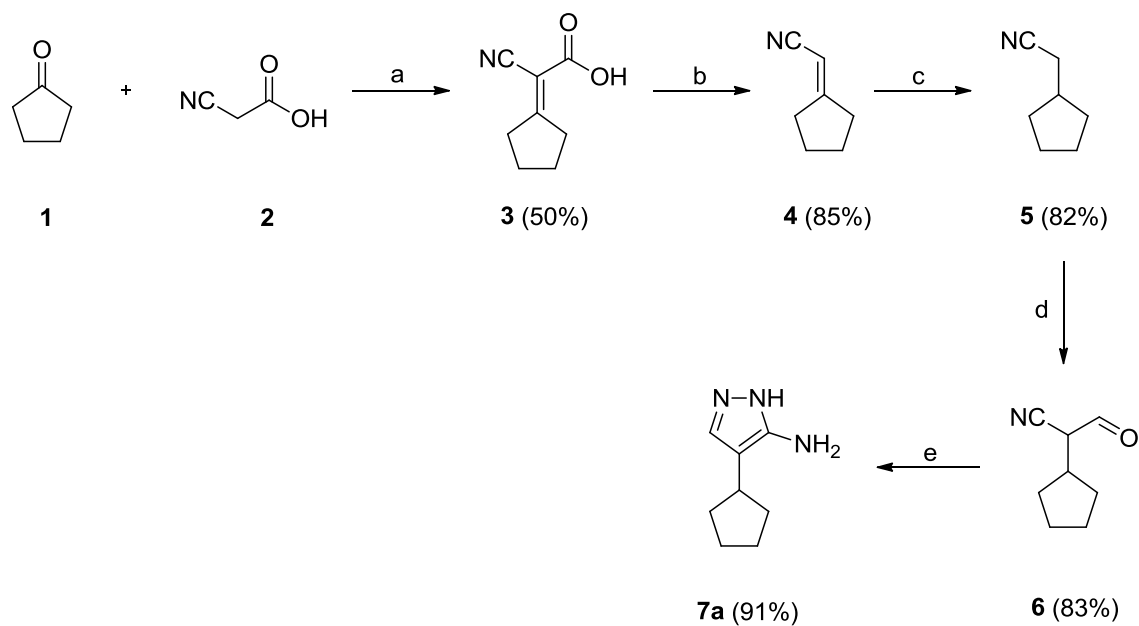
Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty vykazují velký potenciál jako inhibitory různých enzymů včetně CDK a fungují také jako ligandy mnoha receptorů zapojených do významných signálních drah (viz kapitola 2.3.1), (Nie a kol., 2008; Bettayeb a kol., 2008; Raboisson a kol., 2002a). Doposud publikovaná literatura tak ukazuje, že specificky substituovaný pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový heterocyklus může vést k identifikaci nové řady léčiv pro terapii proliferativních a dalších onemocnění (Bettayeb a kol., 2008; Popowycz a kol., 2009).

### 4.1 Syntéza pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů

V rámci této diplomové práce byla pro přípravu pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu zvolena varianta napojení 1,3,5-triazinového cyklu na připravený pyrazolový cyklus, která je nejčastěji využívanou metodou a poskytuje nejvíce možností pro případnou optimalizaci postupu (viz kapitola 2.3.2), (Salem a kol., 1993; Nie a kol., 2007; Bekircan a kol., 2005).

#### 4.1.1 Příprava 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu

Pro přípravu 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**7a**) byl zvolen pěti-krokový postup (Obr. 76) zahrnující kondenzaci cyklopentanonu (**1**) s kyselinou kyanooctovou (**2**), dekarboxylaci vzniklé 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny (**3**), redukci 2-cyklopentylideneacetonitrilu (**4**) na 2-cyklopentylacetonitril (**5**), tvorbu 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitrilu (**6**) a konečnou cyklizaci za vzniku 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**7a**), (WO 2004022560 A1).



- a:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , toluen,  $140^\circ\text{C}$ , 2-3 h  
 b: ethylenglykol, Cu,  $160^\circ\text{C}$ , 2 h  
 c: Pd-C,  $\text{H}_2$ , MeOH, lab. t.  
 d: LDA,  $\text{HCOOC}_2\text{H}_5$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$ , 45 min, lab. t., 20 h  
 e:  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , AcOH, EtOH,  $100^\circ\text{C}$ , 36 h

Obr. 76: Schéma syntézy 4-cyklopentyl-1H-pyrazol-5-aminu s uvedením procentuálních výtěžků jednotlivých produktů.

Kyselina 2-kyano-2-cyklopentylidenoctová (3) byla připravena kondenzací cyklopentanonu (1) s kyselinou kyanooctovou (2) v přítomnosti octanu amonného při  $140^\circ\text{C}$ , jako rozpouštědlo byl zvolen toluen. Průběh reakce byl kontrolován na základě množství vyprodukované vody (WO 2004022560 A1). Reakce proběhla s 50% výtěžkem, ale bez vzniku vedlejších produktů, a tak nebyla dále optimalizována. Literatura také uvádí obdobný postup s 84% výtěžkem při použití benzenu namísto toluenu (Sharma a Bhatia, 1989). Tato možnost ale v rámci této diplomové práce vyzkoušena nebyla.

Dále byla provedena dekarboxylace 2-kyano-2-cyklopentylidenoctové kyseliny (3) za vzniku 2-cyklopentylideneacetonitrilu (4). Jako katalyzátor byla využita prášková měď, reakce probíhala v ethylenglykolu při teplotě  $160^\circ\text{C}$  po dobu 2 hodin (WO 2004022560 A1). Výtěžek reakce činil 85 %. Látka neobsahuje chromofory a nelze ji tak detekovat UV světlem. Produkt nebyl charakterizován ani prostřednictvím HPLC-ESI-MS analýzy, protože zde nedochází k ionizaci.

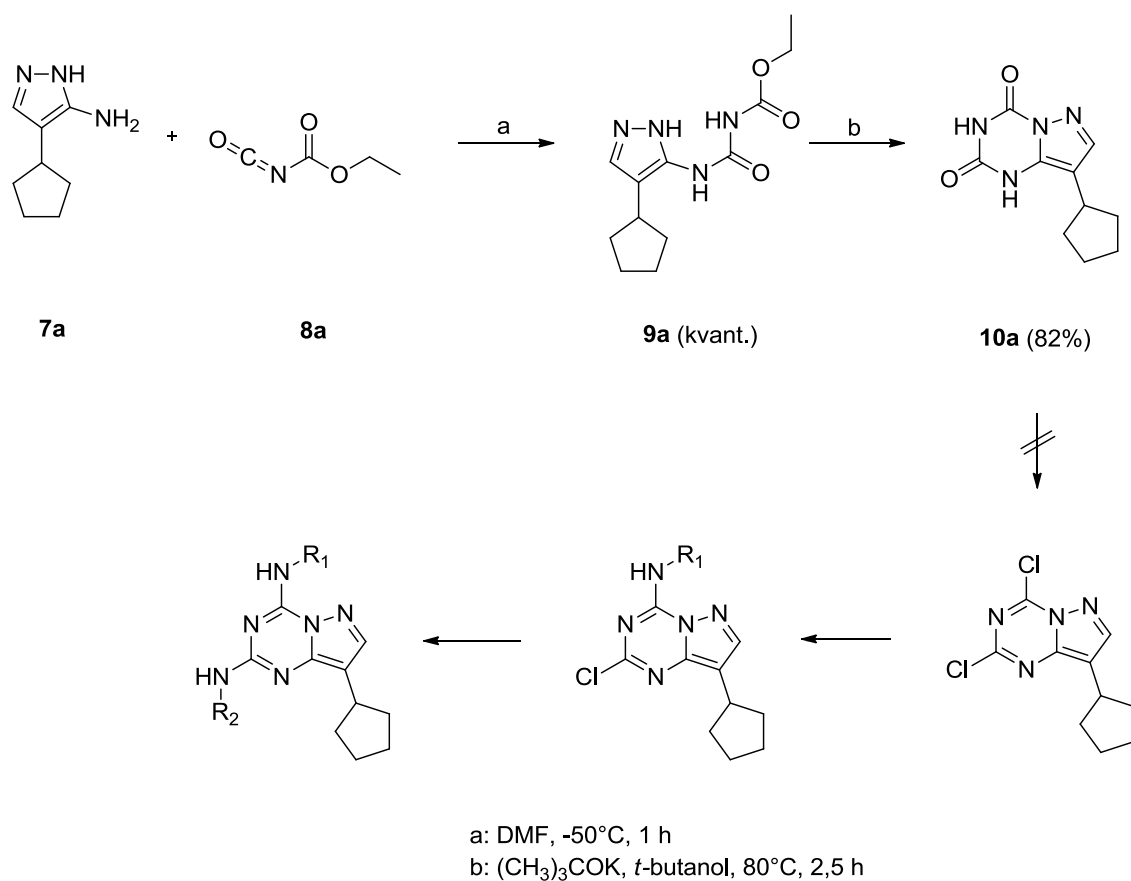
Připravený 2-cyklopentylideneacetonitril (**4**) byl následně redukován vodíkem na 2-cyklopentylacetonitril (**5**) za přítomnosti 10% palladia na aktivním uhlí. Hydrogenace probíhala v methanolu za laboratorní teploty a průběh reakce byl sledován na základě spotřeby vodíku (Park a kol., 1986; WO 2004022560 A1). Reakce proběhla s 82% výtěžkem bez vzniku vedlejších produktů a potřeby čištění produktu. Látka není detekovatelná UV zářením ani prostřednictvím HPLC-ESI-MS analýzy.

Následně byla k 2-cyklopentylacetonitrilu (**5**) připojena aldehydická skupina reakcí s 2M roztokem diisopropylamidu litného a ethylformiátem. Reakce probíhala při chlazení na -78 °C v tetrahydrofuranu a po přidání všech reaktantů se reakční směs ponechala míchat do druhého dne za postupného zteplání na laboratorní teplotu (WO 2014144455 A1). Výtěžek reakce byl 83 %, výraznější vedlejší produkty nebyly detekovány a získaný produkt byl ihned použit do dalšího reakčního stupně. Z důvodu nízké stability nebyl 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitril (**6**) dále charakterizován jinými metodami než TLC metodou.

Získaný 2-cyklopentyl-3-oxopropanenitril (**6**) byl posléze cyklizován na 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-amin (**7a**). Cyklizace probíhala při 100 °C v přítomnosti 80 % roztoku hydrazin hydrátu a kyseliny octové po dobu 36 hodin (US 2013317022 A1). Výtěžek reakce byl 91 %. Vzhledem k přítomnosti více vedlejších produktů byl produkt dále čištěn jak acidobazickou extrakcí, tak kolonovou chromatografií. Amino-pyrazolový derivát (**7a**) vytváří dvě tautomerní formy: 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-3-amin a 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-amin. Na základě NMR analýzy lze říci, že mírnější preferenci vykazuje 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminová forma.

#### 4.1.2 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup A)

Jako první varianta pro přípravu pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů byla zvolena reakce a následná heterocyklizace připraveného 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**7a**) s ethoxykarbonyl isokyanátem (**8a**) (Obr. 77), (Capuano a Schrepfer, 1971).



Obr. 77: Obecné schéma přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup A) s procentuálním výtěžkem připravených produktů.

Před samotnou heterocyklizací bylo potřeba, aby se ethoxykarbonyl isokyanát (**8a**) navázal na aminoskupinu v pozici C5 pyrazolového kruhu. Reakce probíhala při -50 °C po dobu 1 hodiny, jako rozpouštědlo byl zvolen dimethylformamid (Capuano a Schrepfer, 1971). Výtěžek reakce byl kvantitativní. Na základě kontroly metodou TLC a následné HPLC-MS analýzy byly kromě požadovaného produktu (**9a**) také detekovány další vedlejší produkty. Významným vedlejším produktem byl 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazolový derivát s navázaným ethoxykarbonyl isokyanátem na aminoskupině v pozici C5 a také v pozici N1 na pyrazolovém kruhu ( $M_r = 381,38$ ). Požadovaný produkt (**9a**) byl ze směsi získán pomocí krystalizace v ethylacetátu s 30% výtěžkem.

Po získání čistého ethylesteru kyseliny 4-(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)allofanové (**9a**) byla provedena heterocyklizace za vzniku 8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu (**10a**), (Sun a kol., 2013a). Reakce probíhala v *tert*-butanolu v přítomnosti *tert*-butoxidu draselného

při 80 °C po dobu 2 a půl hodiny. Požadovaný produkt byl získán s 82% výtěžkem bez nutnosti dalšího čištění.

Pro přípravu pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových trisubstituovaných derivátů bylo dále potřeba provést chloraci připraveného 8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu (**10a**) v pozicích C2 a C4. V rámci přípravy 2,4-dichlor-8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu bylo odzkoušeno více reakčních postupů (Tab. 9). Požadovaný produkt se ovšem nepodařilo ani v jednom případě získat. Ve většině případů došlo ke vzniku pouze monochlorderivátu, tedy 2-chlor-8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-onu. Literatura syntézu 2,4-dichlorpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů neuvádí, dohledat lze pouze přípravu 4-chlor-2,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů (He a kol., 2000).

Tab. 9: Různé varianty reakčních postupů při přípravě 2,4-dichlor-8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu.

chlorační činidlo	báze	rozpouštědlo	teplota	reakční doba	produkt	výtěžek
fenylfosforexydichlorid	-	-	100 °C	20 h	monoch. <sup>a</sup>	62 %
fenylfosforexydichlorid	2,6-DMP	-	120 °C	3 h	monoch. <sup>a</sup>	50 %
POCl <sub>3</sub>	TEA	toluen	105 °C	2 h	ch. n. <sup>b</sup>	kvant. <sup>c</sup>
POCl <sub>3</sub>	2,6-DMP	-	105 °C	18 h	monoch. <sup>a</sup>	55 %

<sup>a</sup> monoch. = monochlorderivát

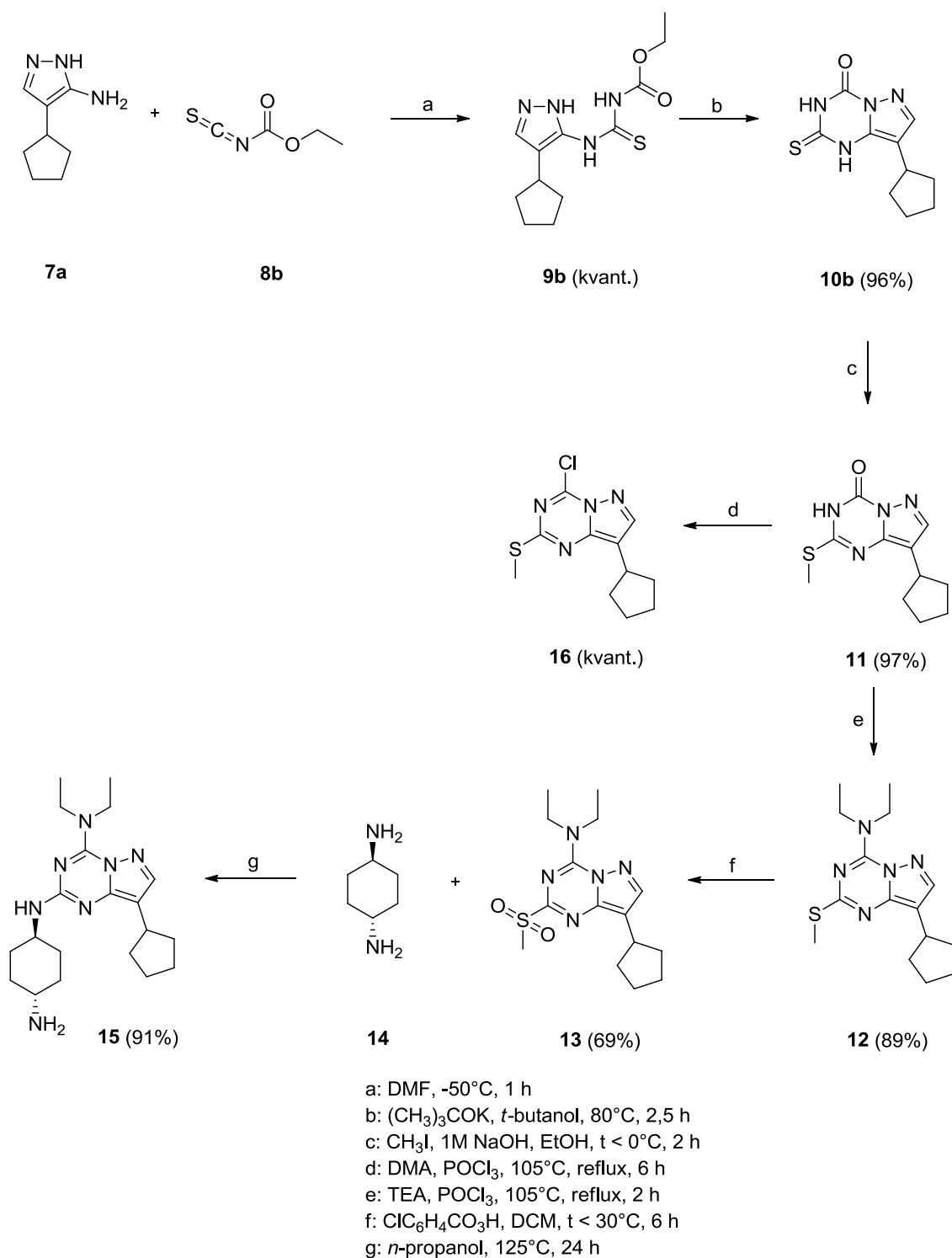
<sup>b</sup> ch. n. = chlorderivát nepřítomen

<sup>c</sup> kvant. = kvantitativní výtěžek

#### 4.1.3 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B1)

Vzhledem k neúspěšné syntéze 2,4-dichlor-8-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu byl pro přípravu trisubstituovaných pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů zvolen odlišný postup zahrnující reakci a následnou cyklizaci 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-aminu (**7a**) s ethoxykarbonyl isothiokyanátem (**8b**) (Obr. 78), (US 2007078136 A1; WO 2012017030 A1).





Obr. 78: Schéma přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B1) s procentuálním výtěžkem připravených produktů.

Před samotnou heterocyklizací bylo potřeba ethoxykarbonyl isothiokyanát (**8b**) opět navázat na aminoskupinu v pozici C5 pyrazolového kruhu. Reakční podmínky byly totožné s předchozím postupem (**9a**, Postup A), (WO 2014189830 A1). Výtěžek reakce byl kvantitativní. Na základě kontroly metodou TLC a následné HPLC-MS analýzy byl

kromě požadovaného produktu (**9b**) identifikován hlavní vedlejší produkt – a to 4-cyklopentyl-1*H*-pyrazolový derivát s navázaným ethoxykarbonyl isothiokyanátem na aminoskupině v pozici C5 a také v pozici N1 na pyrazolovém kruhu ( $M_r = 413,51$ ). Surový produkt bylo tak potřeba čistit pomocí kolonové chromatografie.

Po získání čistého ethyl-*N*-[(4-cyklopentyl-1*H*-pyrazol-5-yl)karbamothioyl]karbamátu (**9b**) byla provedena heterocyklizace za vzniku 8-cyklopentyl-2-thioxo-2,3-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(1*H*)-onu (**10b**). Reakční podmínky byly totožné s předchozím postupem (**10a**, Postup A), (WO 2012017030 A1). Požadovaný produkt byl získán s 96% výtěžkem bez nutnosti dalšího čištění.

Následně bylo potřeba provést regio-selektivní *S*-methylylaci v pozici C2 připraveného produktu (**10b**). Zde bylo vyzkoušeno více reakčních postupů (Tab. 10). Zásadním faktorem je v rámci přípravy 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-onu (**11**) reakční teplota. Při teplotě vyšší než 0 °C dochází ke vzniku *O,S*-dimethylderivátu, tedy 8-cyklopentyl-4-methoxy-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu ( $M_r = 264,35$ ). Při teplotách nižších než -30 °C se prodlužuje reakční doba. Rozhodující je také celkové množství použité báze, při nižších koncentracích se opět prodlužuje reakční doba. Nejlepší výsledek přinesla reakce s methyljodidem v přítomnosti 1M hydroxidu sodného (5 eq.) při teplotě pod 0 °C, jako rozpouštědlo byl zvolen ethanol (Kobe a kol., 1974; Saito a kol., 2011). Výtěžek reakce byl 97 %, produkt nebylo potřeba dále čistit.

Tab. 10: Různé varianty reakčních postupů při přípravě 8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4(3*H*)-onu.

methylační činidlo	báze	rozpouštědlo	teplota	reakční doba	produkt	výtěžek
CH <sub>3</sub> -I	1M NaOH	EtOH	lab. t. °	2 h	<i>O,S</i> -dimethylderivát	89 %
CH <sub>3</sub> -I	1M NaOH	EtOH	< 0 °C	2 h	<i>S</i> -methylderivát	97 %
CH <sub>3</sub> -I	1M NaOH	EtOH	< -30 °C	20 h	<i>S</i> -methylderivát	94 %
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeOH	< -30 °C	16 h	<i>O,S</i> -dimethylderivát	96 %

° lab. t. = laboratorní teplota

Dále bylo třeba připravit 4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin (**16**). V rámci tohoto bodu bylo opět vyzkoušeno více reakčních postupů (Tab. 11). V případě chlorace v přítomnosti triethylaminu došlo namísto 4-chlorpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového derivátu ke vzniku 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (**12**) s 89% výtěžkem. Tento produkt byl následně použit do dalších reakcí. Dále byl zvolen postup zahrnující využití *N,N*-dimethylanilinu jako báze (Kobe a kol., 1974; Mejdrová a kol., 2015). V tomto případě se podařilo požadovaný produkt získat, ovšem v nedostatečném množství a čistotě pro následné reakční stupně. Zásadní je zde způsob zpracování produktu. Při standartním zpracování, kdy je reakční směs vlita do vody a následně extrahována, dochází u 4-chlorpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového derivátu k opětovnému vzniku oxoskupiny v pozici C4. Z tohoto důvodu byl pro zpracování 4-chlorpyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového derivátu zvolen odlišný postup zahrnující odpaření trichloridu fosforu a následnou extrakci do toluenu (viz **16**, Postup B1; **20**, Postup B2).

Tab. 11: Různé varianty reakčních postupů při přípravě 4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu.

chlorační činidlo	báze	teplota	reakční doba	Produkt	Výtěžek
POCl <sub>3</sub>	-	105 °C	4 h	n. <sup>d</sup>	-
POCl <sub>3</sub>	TEA	105 °C	2 h	<i>N,N</i> -diethylderivát	89 %
POCl <sub>3</sub>	<i>N,N</i> -DMA	105 °C	6 h	4-chlorderivát	kvant. <sup>c</sup>
fenyfosforoxydichlorid	TEA	105 °C	2 h	n. <sup>d</sup>	-

<sup>c</sup> kvant. = kvantitativní výtěžek

<sup>d</sup> n. = nereagovalo

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo připravit dostatečné množství čistého 4-chlor-8-cyklopentyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu (**16**), byl do následné reakce použit 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**12**). Další reakce představovala oxidaci thioxoskupiny v pozici C2 za vzniku sulfonylové skupiny. Reakce probíhala v přítomnosti 3-chlorperbenzoové kyseliny

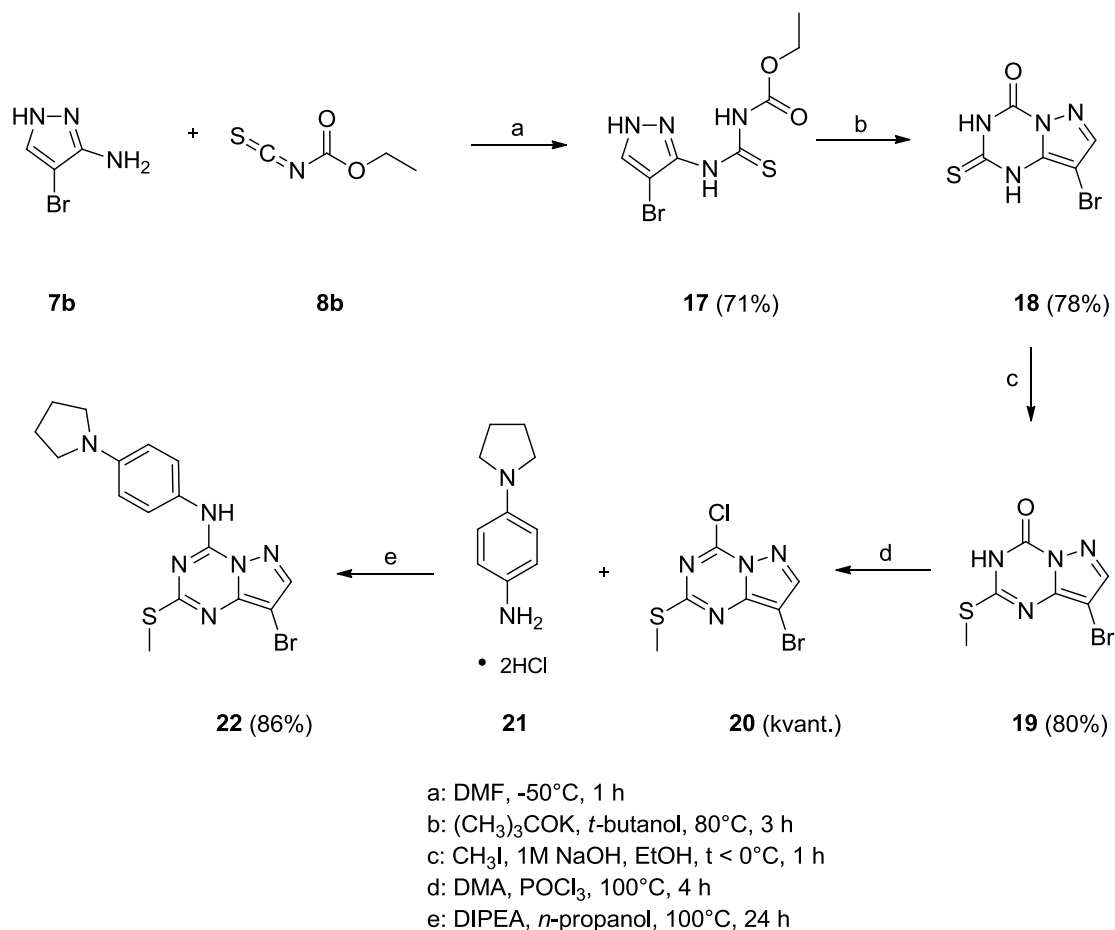
za mírného chlazení ( $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) po dobu 6 hodin, jako rozpouštědlo byl zvolen dichlormethan (WO 2014015675 A1). Reakce proběhla s 69% výtěžkem. Kromě požadovaného produktu (**13**) došlo ke vzniku několika vedlejších produktů. Jako hlavní vedlejší produkt byl identifikován oxidační meziprodukt 2-(methylsulfinyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový derivát ( $M_r = 321,44$ ). I přes přítomnost několika vedlejších produktů produkt čištěn nebyl a byl použit do další reakce.

Následně byla provedena nukleofilní substituce methylsulfonylové skupiny v pozici C2 připraveného 8-cyklopentyl-*N,N*-diethyl-2-(methylsulfonyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-aminu (**13**) s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem (**14**). Reakce probíhala bez použití báze v *n*-propanolu při teplotě 125 °C po dobu 24 hodin, reakční výtěžek byl 91 %. Vzhledem k přítomnosti více vedlejších produktů bylo surový produkt následně potřeba čistit pomocí kolonové chromatografie.

#### 4.1.4 Příprava pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B2)

V rámci třetího postupu přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů byl pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinový heterocyklus připraven reakcí a následným zacyklením komerčně dostupného 4-brom-1*H*-pyrazol-3-aminu (**7b**) s ethoxykarbonyl isothiokyanátem (**8b**), (US 2007078136 A1; WO 2012017030 A1). Deriváty **17**, **18**, **19** a **20** byly tedy připraveny stejným postupem jako v předchozím případě (viz kapitola 3.2.3, Postup B1 a kapitola 3.2.4, Postup B2). Reakční podmínky i výtěžky jednotlivých reakcí jsou uvedeny na Obr. 79.

Posledním získaným derivátem byl 8-brom-2-(methylthio)-*N*-(4-(pyrrolidin-1-yl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin-4-amin (**22**). Ten byl připraven nukleofilní substitucí chloru v pozici C4 8-brom-4-chlor-2-(methylthio)pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu s 4-(pyrrolidin-1-yl)anilinem dihydrochloridem (**21**). Reakce probíhala v přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu při 100 °C, jako rozpouštědlo byl zvolen *n*-propanol. Reakce proběhla s 89% výtěžkem. Vzhledem k přítomnosti vedlejšího produktu bylo surový produkt potřeba čistit pomocí kolonové chromatografie.



Obr. 79: Schéma přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (Postup B2) s procentuálním výtěžkem připravených produktů

## 4.2 Biologická aktivita vybraných derivátů

Na základě biologických testů provedených Mgr. Evou Řezníčkovou, Ph.D. v rámci Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. lze říci, že vybrané pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové deriváty **15** a **22** vykazují inhibiční aktivitu vůči CDK2 v mikromolárních koncentracích. Derivát **15** je účinnějším inhibitorem CDK2 oproti derivátu **22**. Antiproliferační vlastnosti derivátu **15** se projevily u obou testovaných buněčných linií, výraznější antiproliferační účinek byl detekován u leukemické linie K562. U derivátu **22** nebyla v případě testovaných buněčných linií prokázána výraznější antiproliferační aktivita.

I přes prokázanou inhibiční aktivitu nejsou připravené deriváty **15** a **22** tak účinnými inhibitory jako pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinové bioisostery roskovitinu

(**XXIX**) nebo purvalanolu A (**XXXI**) (Tab. 12), (Bettayeb a kol., 2008; Popowycz a kol., 2009).

*Tab. 12: Porovnání hodnot  $IC_{50}$  (CDK2/cyklin A) připravených derivátů **15** a **22** s roskovitinem, purvalanolem A a jejich pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazinovými bioisostery.*

<b>inhibitor</b>	<b><math>IC_{50}</math> (CDK2/cyklin A) [<math>\mu</math>M]</b>
roskovitin	0,22
<b>XXIX</b>	0,04
purvalanol A	0,07
<b>XXXI</b>	0,06
<b>15</b>	0,50
<b>22</b>	1,10

## 5 Závěr

V teoretické části diplomové práce byla sepsána literární rešerše týkající se základních poznatků o cyklin-dependentních kinázách a jejich nejvýznamnějších inhibitech, dále byl vytvořen přehled důležitých purinových bioisosterů a následně byly shrnuty informace o biologické aktivitě doposud popsaných pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů a syntetických přístupech vedoucí k přípravě pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinového heterocyklu.

Experimentální část byla zaměřena na studium různých syntetických přístupů přípravy pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů. Připraveno bylo 11 pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinových derivátů (**10a**, **10b**, **11**, **12**, **13**, **15**, **16**, **18**, **19**, **20**, **22**), z toho 8 látek (**10a**, **10b**, **11**, **12**, **13**, **15**, **16**, **22**) doposud nebylo publikováno. U dvou vybraných derivátů (**15** a **22**) byla testována inhibiční aktivita vůči kináze CDK2 a také antiproliferační aktivita u buněčných linií K562 a MCF-7. Derivát **15** významně potlačuje aktivitu CDK2 ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$ ), jeho antiproliferační vlastnosti se projevily u obou testovaných buněčných linií, výraznější antiproliferační efekt byl detekován u leukemické linie K562. Derivát **22** vykazuje vůči CDK2 nižší inhibiční aktivitu ( $IC_{50} = 1,1 \mu M$ ) a u testovaných buněčných linií nebyl prokázán výraznější antiproliferační účinek.

Přestože připravené látky nemají tak velký inhibiční a antiproliferační potenciál jako některé jiné publikované deriváty purinu a jeho strukturních analogů, mají vyzkoušené postupy potenciální význam pro syntézu nových terapeutik k léčbě nejen nádorových onemocnění.

## Použitá literatura

Abed N. M., Elagamey A. G. A., Harb A. F. A. (1988) Some reactions with  $\alpha,\beta$ -unsaturated acyl isothiocyanates. *J. Chem. Soc. Pak.* **10**, 151.

Abraham R., Acquarone M., Andersen A., Asensi A., Bellé R., Berger F., Bergounioux C., Brunn G., Buquet-Fagot C., Fagot D., Glab N., Goudeau H., Goudeau M., Guerrier P., Houghton P., Hendriks H., Kloareg B., Lippai M., Marie D., Maro B., Meijer L., Mester J., Mulner-Lorillon O., Poulet S., Schierenberg E., Schutte B., Vaultot D., Verlhac M. (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell.* **83**, 105-120.

Aggarwal P., Vaites L. P., Kim J. K., Mellert H., Gurung B., Nakagawa H., Herlyn M., Hua X., Rustgi A. K., McMahon S. B., Diehl J. A. (2010) Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell.* **18**, 329-340.

Akoulitchev S., Chuikov S., Reinberg D. (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature.* **407**, 102-106.

Ali F., Hindley C., McDowell G., Deibler R., Jones A., Kirschner M., Guillemot F., Philpott A. (2011) Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development.* **138**, 4267-4277.

Andrews M. J. I., McInnes C., Kontopidis G., Innes L., Cowan A., Plater A., Fischer P. M. (2004) Design, synthesis, biological activity and structural analysis of cyclic peptide inhibitors targeting the substrate recruitment site of cyclin-dependent kinase complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2735-2741.

Arif A. (2012) Extraneuronal activities and regulatory mechanisms of the atypical cyclin-dependent kinase Cdk5. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 985-993.

Arisan E. D., Obakan P., Coker-Gurkan A., Calcabrini A., Agostinelli E., Unsal N. P. (2014) CDK inhibitors induce mitochondria-mediated apoptosis through the activation of polyamine catabolic pathway in LNCaP, DU145 and PC3 prostate cancer cells. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 180-188.



Arris C. E., Boyle F. T., Calvert A. H., Curtin N. J., Endicott J. A., Garman E. F., Gibson A. E., Golding B. T., Grant S., Griffin R. J., Jewsbury P., Johnson L. N., Lawrie A. M., Newell D. R., Noble M. E., Sausville E. A., Schultz R., Yu W. (2000) Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. *J. Med. Chem.* **43**, 2797-2804.

Audetat K. A., Galbraith M. D., Odell A. T., Lee T., Pandey A., Espinosa J. M., Dowell R. D., Taatjes D. J. (2017) A kinase-independent role for cyclin-dependent kinase 19 in p53 response. *Mol. Cell. Biol.* **37**, e00626-16.

Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S. P., Tang L., Jiang T., Liang D. C., Galons H., Dierick J. F., Pinna L. A., Meggio F., Totzke F., Schächtele C., Lerman A. S., Carnero A., Wan Y., Gray N., Meijer L. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 31208-31219.

Balakrishnan A., Vyas A., Deshpande K., Vyas D. (2016) Pharmacological cyclin dependent kinase inhibitors: Implications for colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**, 2159-2164.

Barone G., Staples C. J., Ganesh A., Patterson K. W., Bryne D. P., Myers K. N., Patil A. A., Evers C. E., Maslen S., Skehel J. M., Evers P. A., Collis S. J. (2016) Human CDK18 promotes replication stress signaling and genome stability. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8772-8785.

Bartkowiak B., Liu P., Phatnani H. P., Fuda N. J., Cooper J. J., Price D. H., Adelman K., Lis J. T., Greenleaf A. L. (2010) CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1. *Genes Dev.* **24**, 2303-2316.

Bazin M. A., Rousseau B., Marhadour S., Tomasoni C., Evenou P., Piessard S., Vaisberg A. J., Ruchaud S., Bach S., Roussakis C., Marchand P. (2016) Discovery of novel (imidazo[1,2-a]pyrazin-6-yl)ureas as antiproliferative agents targeting P53 in non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res.* **36**, 1621-1630.

Beaver J. A., Amiri-Kordestani L., Charlab R., Chen W., Palmby T., Tilley A., Zirkelbach J. F., Yu J., Liu Q., Zhao L., Crich J., Chen X. H., Hughes M., Bloomquist E., Tang S., Sridhara R., Kluetz P. G., Kim G., Ibrahim A., Pazdur R., Cortazar P. (2015) FDA approval: palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4760-4766.

Bekircan O., Kucuk M., Kahveci B., Kolaylı S. (2005) Synthesis of fused heterocyclic 1,3,5-triazines from some n-acyl imidates and heterocyclic amines as anticancer and antioxidant agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **338**, 365-372.

Benson C., Kaye S., Workman P., Garrett M., Walton M., de Bono J. (2005) Clinical anticancer drug development: Targeting the cyclin-dependent kinases. *Br. J. Cancer.* **92**, 7-12.

Benson C., White J., De Bono J., O'Donnell A., Raynaud F., Cruickshank C., McGrath H., Walton M., Workman P., Kaye S., Cassidy J., Gianella-Borradori A., Judson I., Twelves C. (2007) A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br. J. Cancer.* **96**, 29-37.

Bernabò N., Valbonetti L., Greco L., Capacchietti G., Sanchez M. R., Palestini P., Botto L., Mattioli M., Barboni B. (2017) Aminopurvalanol A, a potent, selective, and cell permeable inhibitor of cyclins/cdk complexes, causes the reduction of in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa, by negatively affecting the capacitation-dependent actin polymerization. *Front. Physiol.* **8**, 1097.

Bettayeb K., Sallam H., Ferandin Y., Popowycz F., Fournet G., Hassan M., Echalièr A., Bernard P., Endicott J., Joseph B., Meijer L. (2008) N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer. Ther.* **7**, 2713-2724.

Bible K. C., Bible R. H. Jr., Kottke T. J., Svingen P. A., Xu K., Pang Y. P., Hajdu E., Kaufmann S. H. (2000) Flavopiridol binds to duplex DNA. *Cancer Res.* **60**, 2419-2428.

- Blazek D., Kohoutek J., Bartholomeeusen K., Johansen E., Hulinkova P., Luo Z., Cimermancic P., Ule J., Peterlin B. M. (2011) The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev.* **25**, 2158-2172.
- Blume-Jensen P., Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature.* **411**, 355-365.
- Bogoyevitch M. A., Barr R. K., Ketterman A. J. (2005) Peptide inhibitors of protein kinases-discovery, characterisation and use. *Biochim. Biophys. Acta.* **1754**, 79-99.
- Broekhuis J. R., Verhey K. J., Jansen G. (2014) Regulation of cilium length and intraflagellar transport by the RCK-kinases ICK and MOK in renal epithelial cells. *PLOS ONE.* **9**, e108470.
- Cabon G., Gaucher B., Gegout A., Heulle S., Masquelin T. (2003) Novel solution- and solid-phase syntheses of heterocyclic systems. *CHIMIA.* **57**, 248-254.
- Cai D., Byth K. F., Shapiro G. I. (2006) AZ703, an imidazo[1,2-a]pyridine inhibitor of cyclin-dependent kinases 1 and 2, induces E2F-1-dependent apoptosis enhanced by depletion of cyclin-dependent kinase 9. *Cancer Res.* **66**, 435-444.
- Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014) Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol. Biol.* **14**, 10.
- Cao X., Liang L., Hadcock J. R., Iredale P. A., Griffith D. A., Menniti F. S., Factor S., Greenamyre J. T., Papa S. M. (2007) Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 318-326.
- Capuano L., Schrepfer H. J. (1971) Heterocyclisierungen, IX Darstellung von Pyrazolo-, Triazolo-, Oxazolo- und Thiazolo-s-triazinen mit Brückenkopf-Stickstoff sowie eines N-Äthoxycarbonyl-isopurins. *Chem. Ber.* **104**, 3039-3047.
- Carlson B. A., Dubay M. M., Sausville E. A., Brizuela L., Worland P. J. (1996) Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **56**, 2973-2978.

- Carlson B., Lahusen T., Singh S., Loaiza-Perez A., Worland P. J., Pestell R., Albanese C., Sausville E. A., Senderowicz A. M. (1999) Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res.* **59**, 4634-4641.
- Carlsten J. O., Zhu X., Gustafsson C. M. (2013) The multitasking Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 531-537.
- Cerqueira A., Martín A., Symonds C. E., Odajima J., Dubus P., Barbacid M., Santamaría D. (2014) Genetic characterization of the role of the Cip/Kip family of proteins as cyclin-dependent kinase inhibitors and assembly factors. *Mol. Cell. Bio.* **34**, 1452-1459.
- Cicenas J., Kalyan K., Sorokinas A., Stankunas E., Levy J., Meskinyte I., Stankevicius V., Kaupinis A., Valius M. (2015) Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann. Transl. Med.* **3**, 135.
- Cook M. A., Hamilton J. T., Okwuasaba F. K. (1978) Coenzyme A is a purine nucleotide modulator of acetylcholine output. *Nature.* **271**, 768-771.
- Corbi-Verge C., Kim P. M. (2016) Motif mediated protein-protein interactions as drug targets. *Cell Commun. Signal.* **14**, 8.
- Corona S. P., Generali D. (2018) Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 321-330.
- Coudreuse D., Nurse P. (2010) Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature.* **468**, 1074-1079.
- Coverley D., Pelizon C., Trewick S., Laskey R. A. (2000) Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J. Cell. Sci.* **113**, 1929-1938.
- Davidson G., Shen J., Huang Y. - L., Su Y., Karaulanov E., Bartscherer K., Hassler C., Stanek P., Boutros M., Niehrs C. (2009) Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev. Cell.* **17**, 788-799.

- Davies T. G., Bentley J., Arris C. E., Boyle F. T., Curtin N. J., Endicott J. A., Gibson A. E., Golding B. T., Griffin R. J., Hardcastle I. R., Jewsbury P., Johnson L. N., Mesguiche V., Newell D. R., Noble M. E., Tucker J. A., Wang L., Whitfield H. J. (2002) Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 745-749.
- Day P. J., Cleasby A., Tickle I. J., O'Reilly M., Coyle J. E., Holding F. P., McMenamin R. L., Yon J., Chopra R., Lengauer C., Jhoti H. (2009) Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 4166-4170.
- de Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlíček L., Strnad M., Kim S. H. (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **243**, 518-526.
- de Lera Ruiz M., Lim Y. H., Zheng J. (2014) Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J. Med. Chem.* **57**, 3623-3650.
- de Zwart M., Vollinga R. C., Beukers M. W., Slegers D. F., Kunzel J. K. F. D., de Groote M., Ijzerman A. P. (1999) Potent antagonists for the human adenosine A2B receptor. Derivatives of the triazolotriazine adenosine receptor antagonist ZM241385 with high affinity. *Drug Dev. Res.* **48**, 95.
- Deshpande A., Sicinski P., Hinds P. W. (2005) Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* **24**, 2909-2915.
- Dey A., Wong E. T., Cheok C. F., Tergaonkar V., Lane D. P. (2008) R-Roscovitine simultaneously targets both the p53 and NF-kappaB pathways and causes potentiation of apoptosis: implications in cancer therapy. *Cell Death Differ.* **15**, 263-273.
- Dickler M. N., Tolaney S. M., Rugo H. S., Cortés J., Diéras V., Patt D., Wildiers H., Hudis C. A., O'Shaughnessy J., Zamora E., Yardley D. A., Frenzel M., Koustenis A., Baselga J. (2017) MONARCH 1, A phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5218-5224.

Diwan P., Lacasse J. J., Schang L. M. (2004) Roscovitine inhibits activation of promoters in herpes simplex virus type 1 genomes independently of promoter-specific factors. *J. Virol.* **78**, 9352-9365.

Doré A. S., Robertson N., Errey J. C., Ng I., Hollenstein K., Tehan B., Hurrell E., Bennett K., Congreve M., Magnani F., Tate C. G., Weir M., Marshall F. H. (2011) Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure.* **19**, 1283-1293.

Dupre A., Jessus C., Ozon R., Haccard O. (2002) Mos is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **21**, 4026-4036.

Ebmeier C. C., Erickson B., Allen B. L., Allen M. A., Kim H., Fong N., Jacobsen J. R., Liang K., Shilatifard A., Dowell R. D., Old W. M., Bentley D. L., Taatjes D. J. (2017) Human TFIID kinase CDK7 regulates transcription-associated chromatin modifications. *Cell reports.* **20**, 1173-1186.

Eglen R. M., Reisine T. (2010) Human kinome drug discovery and the emerging importance of atypical allosteric inhibitors. *Expert. Opin. Drug Discov.* **5**, 277-290.

Echalier A., Endicott J. A., Noble M. E. (2010) Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 511-519.

Elkamdawy A., Al-Sanea M. M., Song C., Sim T., Roh E. J. (2015) Design and synthesis of new [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidine derivatives as potential antiproliferative agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* **36**, 1863-1873.

Elmoghayar M. R. H., Abdalla S. O., Nasr M. Y. (1984) The reaction of isothiocyanates with 2-cyanoethanoic acid hydrazide. A novel synthesis of 1,3,4-thiadiazoles. *J. Het. Chem.* **21**, 781-784.

Elmoghayar M. R. H., Ghali E. A., Ramiz M. M. M., Elnagdi M. H. (1985) Activated Nitriles in Heterocyclic Synthesis, IV. Synthesis of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1962-1968.

El-Saraf G. A., El-Sayed A. M., El-Saghier A. M. (2003) One-pot PTC synthesis of polyfused pyrazoles. *Heteroatom Chem.* **14**, 211-217.

Erol A., Acikgoz E., Guven U., Duzagac F., Turkkani A., Colcimen N., Oktem G. (2017) Ribosome biogenesis mediates antitumor activity of flavopiridol in CD44+/CD24- breast cancer stem cells. *Oncol. Lett.* **14**, 6433-6440.

Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J., Distel D., Hunt T. (1983) Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* **33**, 389-396.

Fabre C., Gobbi M., Ezzili C., Zoubir M., Sablin M. P., Small K., Im E., Shinwari N., Zhang D., Zhou H., Le Tourneau C. (2014) Clinical study of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in combination with rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **74**, 1057-1064.

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., Hidalgo M., Bannerji R., Nelkin A. M. B. D. (2011) Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biol. Ther.* **12**, 598-609.

Feng H., Cheng A. S., Tsang D. P., Li M. S., Go M. Y., Cheung Y. S., Zhao G. J., Ng S. S., Lin M. C., Yu J., Lai P. B., To K. F., Sung J. J. (2011) Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives beta-catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **121**, 3159-3175.

Finn R. S., Martin M., Rugo H. S., Jones S., Im S. – A., Gelmon K., Harbeck N., Lipatov O. N., Walshe J. M., Moulder S., Gauthier E., Lu D. R., Randolph S., Diéras V., Slamon D. J. (2016) Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1925-1936.

Finn R. S., Crown J. P., Lang I., Boer K., Bondarenko I. M., Kulyk S. O., Ettl J., Patel R., Pinter T., Schmidt M., Shparyk Y., Thummala A. R., Voytko N. L., Fowst C., Huang X., Kim S. T., Randolph S., Slamon D. J. (2015) The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone

as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* **16**, 25-35.

Finn R. S., Dering J., Conklin D., Kalous O., Cohen D. J., Desai A. J., Ginther C., Atefi M., Chen I., Fowst C., Los G., Slamon D. J. (2009) PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines *in vitro*. *Breast Cancer Res.* **11**, R77.

Firestein R., Bass A. J., Kim S. Y., Dunn I. F., Silver S. J., Guney I., Freed E., Ligon A. H., Vena N., Ogino S., Chheda M. G., Tamayo P., Finn S., Shrestha Y., Boehm J. S., Jain S., Bojarski E., Mermel C., Barretina J., Chan J. A., Baselga J., Tabernero J., Root D. E., Fuchs C. S., Loda M., Shivdasani R. A., Meyerson M., Hahn W. C. (2008) CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature.* **455**, 547-551.

Fisher R. P. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J. Cell. Sci.* **118**, 5171-5180.

Fischer E., Kreutzmann J., Rembarz G., Rosenthal S. (1976) Preparation and reactions of substituted [1,5-a]pyrazolo[1,3,5]triazines. *Pharmazie.* **31**, 546-548.

Fischmann T. O., Hruza A., Duca J. S., Ramanathan L., Mayhood T., Windsor W. T., Le H. V., Guzi T. J., Dwyer M. P., Paruch K., Doll R. J., Lees E., Parry D., Seghezzi W., Madison V. (2008) Structure-guided discovery of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biopolymers.* **89**, 372-379.

Flynn J. M., Jones J., Johnson A. J., Andritsos L., Maddocks K., Jaglowski S., Hessler J., Grever M. R., Ellie I., Zhou H., Zhu Y., Zhang D., Small K., Bannerji R., Byrd J. C. (2015) Dinaciclib is a novel cyclin dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* **29**, 1524-1529.

Flynn J. M., Jones J. A., Andritsos L., Blum K. A., Johnson A. J., Hessler J., Wiley E., Poon J., Small K., Statkevich P., Grever M. R., Bannerji R., Byrd J. C. (2010) Update on the Phase I study of the cyclin dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH 727965) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL):



confirmation of clinical activity and feasibility of long-term administration. *ASH Annu. Mtg. Abstr.* **116**, 1396.

Franěk F., Strnad M., Havlíček L., Siglerová V., Fismolová I., Eckschlager T. (2001) Diverse effects of the cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine: Concentration- and time-dependent suppression or stimulation of hybridoma culture. *Cytotechnology.* **36**, 117-123.

Fry D. W., Harvey P. J., Keller P. R., Elliott W. L., Meade M., Trachet E., Albassam M., Zheng X., Leopold W. R., Pryer N. K., Toogood P. L. (2004) Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1427-1438.

Fu A. K. Y., Fu W. - Y., Ng A. K. Y., Chien W. W. Y., Ng Y. - P., Wang J. H., Ip N. Y. (2004) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 6728-6733.

Fu T. J., Peng J. M., Lee G., Price D. H., Flores O. (1999) Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 34527-34530.

Galbraith M. D., Andrysiak Z., Pandey A., Hoh M., Bonner E. A., Hill A. A., Sullivan K. D., Espinosa J. M. (2017) CDK8 kinase activity promotes glycolysis. *Cell Rep.* **21**, 1495-1506.

Ganuza M., Sáiz-Ladera C., Cañamero M., Gómez G., Schneider R., Blasco M. A., Pisano D., Paramio J. M., Santamaría D., Barbacid M. (2012) Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *EMBO J.* **31**, 2498-2510.

Garamvölgyi R., Dobos J., Sipos A., Boros S., Illyés E., Baska F., Kékesi L., Szabadkai I., Szántai-Kis C., Kéri G., Órfi L. (2016) Design and synthesis of new imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives with antiproliferative activity against melanoma cells. *Eur. J. Med. Chem.* **108**, 623-643.

Gary C., Hajek M., Biktasova A., Bellinger G., Yarbrough W. G., Issaeva N. (2016) Selective antitumor activity of roscovitine in head and neck cancer. *Oncotarget*. **7**, 38598–38611.

Gelbert L. M., Cai S., Lin X., Sanchez-Martinez C., del Prado M., Lallena M. J., Torres R., Ajamie R. T., Wishart G. N., Flack R. S., Neubauer B. L., Young J., Chan E. M., Iversen P., Cronier D., Kreklau E., de Dios A. (2014) Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest. New Drugs*. **32**, 825-837.

Georger B., Bourdeaut F., DuBois S. G., Fischer M., Geller J. I., Gottardo N. G., Marabelle A., Pearson A. D. J., Modak S., Cash T., Robinson G. W., Motta M., Matano A., Bhansali S. G., Dobson J. R., Parasuraman S., Chi S. N. (2017) A phase I study of the CDK4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in pediatric patients with malignant rhabdoid tumors, neuroblastoma, and other solid tumors. *Clin. Cancer Res*. **23**, 2433-2441.

Gescher A., Stevens M. F. G., Turnbull C. P. (1977) Triazines and related products. Part 18. Decomposition of 1,2,3-benzotriazines and related triazines with sodium azide in acetic acid- a convenient route to azidoarenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. **8**, 103-106.

Ghia P., Scarfò L., Perez S., Pathiraja K., Derosier M., Small K., McCrary S. C., Patton N. (2017) Efficacy and safety of dinaciclib vs ofatumumab in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **129**, 1876-1878.

Gil J., Peters G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **7**, 667-677.

Gilligan P. J., Clarke T., He L., Lelas S., Li Y. W., Heman K., Fitzgerald L., Miller K., Zhang G., Marshall A., Krause C., McElroy J. F., Ward K., Zeller K., Wong H., Bai S., Saye J., Grossman S., Zaczek R., Arneric S. P., Hartig P., Robertson D., Trainor G. (2009b) Synthesis and structure-activity relationships of 8-(pyrid-3-yl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines: potent, orally bioavailable corticotropin releasing factor receptor-1 (CRF1) antagonists. *J. Med. Chem*. **52**, 3084-3092.

Gilligan P. J., Folmer B. K., Hartz R. A., Koch S., Nanda K. K., Andreuski S., Fitzgerald L., Miller K., Marshall W. J. (2003) Pyrazolo-[1,5-a]-1,3,5-triazine corticotropin-releasing factor (CRF) receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 4093-4102.

Gilligan P. J., He L., Clarke T., Tivitmahaisoon P., Lelas S., Li Y. W., Heman K., Fitzgerald L., Miller K., Zhang G., Marshall A., Krause C., McElroy J., Ward K., Shen H., Wong H., Grossman S., Nemeth G., Zaczek R., Arneric S. P., Hartig P., Robertson D. W., Trainor G. (2009a) 8-(4-Methoxyphenyl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines: selective and centrally active corticotropin-releasing factor receptor-1 (CRF1) antagonists. *J. Med. Chem.* **52**, 3073-3083.

Giordano A., Bellacchio E., Bagella L., Paggi M. G. (2007) Interaction between the Cdk2/cyclin A complex and a small molecule derived from the pRb2/p130 spacer domain: A theoretical model. *Cell Cycle.* **6**, 2591-2593.

Gojo I., Zhang B., Fenton R. G. (2002) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3527-3358.

Gojo I., Sadowska M., Walker A., Feldman E. J., Iyer S. P., Baer M. R., Sausville E. A., Lapidus R. G., Zhang D., Zhu Y., Jou Y. – M., Poon J., Small K., Bannerji R. (2013) Clinical and laboratory studies of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in acute leukemias. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 897-908.

Gokce O., Dogan T. I., Ilke O. H., Erdem O., Erguven K. E., Ekmekci A. (2016) Flavopiridol induces apoptosis via mitochondrial pathway in B16F10 murine melanoma cells and a subcutaneous melanoma tumor model. *Acta Dermatovenerol. Croat.* **24**, 2-12.

Graeser R., Gannon J., Poon R. Y., Dubois T., Aitken A., Hunt T. (2002) Regulation of the CDK-related protein kinase PCTAIRE-1 and its possible role in neurite outgrowth in Neuro-2A cells. *J. Cell. Sci.* **115**, 3479-3490.

Graubaum H., Schweim H. G. (1991) Reactions of 3(5)-aminopyrazole with isocyanates or cyanates and acetone. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **324**, 257-258.

Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T. C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., Schultz P. G. (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*. **281**, 533-538.

Gray N., Détiavaud L., Doerig C., Meijer L. (1999) ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr. Med. Chem.* **6**, 859-875.

Grieco P. A., Yokoyama Y. (1977) Aryl selenocyanates: useful reagents for cyanoselenenylation of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5210-5211.

Gu Y., Rosenblatt J., Morgan D. O. (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11**, 3995-4005.

Gu Y., Turck C. W., Morgan D. O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*. **366**, 707-710.

Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Bazgier V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V. (2013) A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 6234-6247.

Guen V. J., Gamble C., Flajolet M., Unge S., Thollet A., Ferandin Y., Superti-Furga A., Cohen P. A., Meijer L., Colas P. (2013) CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 19525-19530.

Guen V. J., Gamble C., Perez D. E., Bourassa S., Zappel H., Gärtner J., Lees J. A., Colas P. (2016) STAR syndrome-associated CDK10/Cyclin M regulates actin network architecture and ciliogenesis. *Cell Cycle*. **15**, 678-688.

Guillaume M., Lakatos C. (1983) LA 2851, a new bronchodilator and anti-allergic compound which inhibits slow-reacting substance formation. *Prostaglandins. ser.* **3**, 332-337.

Haines A., Bolt J., Dumont Z., Semchuk W. (2018) Pharmacists' assessment and management of acute and chronic gout. *Can. Pharm. J. (Ott)*. **151**, 107-113.

Hall M., Peters G. (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* **68**, 67-108.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* **100**, 57-70.

Hart L. S., Rader J., Raman P., Batra V., Russell M. R., Tsang M., Gagliardi M., Chen L., Martinez D., Li Y., Wood A., Kim S., Parasuraman S., Delach S., Cole K. A., Krupa S., Boehm M., Peters M., Caponigro G., Maris J. M. (2017) preclinical therapeutic synergy of MEK1/2 and CDK4/6 inhibition in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1785-1796.

Hartwell L. H., Culotti J., Pringle J. R., Reid B. J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* **183**, 46-51.

Harwell R. M., Mull B. B., Porter D. C., Keyomarsi K. (2004) Activation of cyclin-dependent kinase 2 by full length and low molecular weight forms of cyclin E in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 12695-12705.

Havlíček L., Fuksová K., Kryštof V., Orság M., B. Vojtěšek, Strnad M. (2005) 8-Azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5399-5407.

Havlíček L., Hanus J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* **40**, 408-412.

He L., Gilligan P. J., Zaczek R., Fitzgerald L. W., McElroy J., Shen H. S. L., Saye J. A., Kalin N. H., Shelton S., Christ D., Trainor G., Hartig P. (2000) 4-(1,3-dimethoxyprop-2-ylamino)-2,7-dimethyl-8-(2,4-dichlorophenyl) pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine: A potent, orally bioavailable CRF1 receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **43**, 449.

Heathcote D. A., Patel H., Kroll S. H., 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., Fuchter M. J., Snyder J. P., Liotta D. C., Freemont P. S., Aboagye E. O., Coombes R. C., Barrett A. G., Ali S. (2010) A novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein

kinases 1, 2, and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration. *J. Med. Chem.* **53**, 8508-8522.

Hikita T., Oneyama C., Okada M. (2010) Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both CDKs and c-Src. *Genes Cells.* **15**, 1051-1062.

Hirose T., Tamaru T., Okumura N., Nagai K., Okada M. (1997) PCTAIRE 2, a Cdc2-related serine/threonine kinase, is predominantly expressed in terminally differentiated neurons. *Eur. J. Biochem.* **249**, 481-488.

Ho A., Dowdy S. F. (2002) Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 47-52.

Ho Y., Costanzo M., Moore L., Kobayashi R., Andrews B. J. (1999) Regulation of Transcription at the *Saccharomyces cerevisiae* Start Transition by Stb1, a Swi6-Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5267-5278.

Hofman J., Kučera R., Cihalova D., Klimes J., Ceckova M., Staud F. (2013) Olomoucine II, but not purvalanol a, is transported by breast cancer resistance protein (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1). *PLOS ONE.* **8**, e75520.

Hofman J., Ahmadimoghaddam D., Hahnova L., Pavek P., Ceckova M., Staud F. (2012) Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 transporter in vitro and in situ and synergistically potentiate cytostatic effect of mitoxantrone. *Pharmacol. Res.* **65**, 312-319.

Hofmann F., Livingston D. M. (1996) Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit. *Genes Dev.* **10**, 851-861.

Hu D., Mayeda A., Trembley J. H., Lahti J. M., Kidd V. J. (2003) CDK11 Complexes Promote Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **278**, 8623-8629.

Huang D., Friesen H., Andrews B. (2007) Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* **66**, 303-314.

- Huertas P., Cortés-Ledesma F., Sartori A. A., Aguilera A., Jackson S. P. (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*. **455**, 689-692.
- Hui A. B. Y., Yue S., Shi W., Alajez N. M., Ito E., Green S. R., Frame S., O'Sullivan B., Liu F. F. (2009) Therapeutic efficacy of seliciclib in combination with ionizing radiation for human nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer. Res.* **15**, 3716-3724.
- Hunt, T. (1991) Cyclins and their partners: From a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell Biol.* **2**, 213-222.
- Husdal A., Bukholm G., Bukholm I. R. K. (2006) The prognostic value and overexpression of cyclin A is correlated with gene amplification of both cyclin A and cyclin E in breast cancer patient. *Cell. Oncol.* **28**, 107-116.
- Chang Y. T., Gray N. S., Rosania G. R., Sutherlin D. P., Kwon S., Norman T. C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P. G. (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **6**, 361-375.
- Chao J. I., Kuo P. C., Hsu T. S. (2004) Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 20267-20276.
- Chao S. H., Fujinaga K., Marion J. E., Taube R., Sausville E. A., Senderowicz A. M., Peterlin B. M., Price D. H. (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* **275**, 28345-28348.
- Chen H. - H., Wang Y. - C., Fann M. - J. (2006) Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2736-2745.
- Chen H. - H., Wong Y. - H., Geneviere A. - M., Fann M. - J. (2007) CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 735-740.

Chen J. - S., Lu L. X., Ohi M. D., Creamer K. M., English C., Partridge J. F., Ohi R., Gould K. L. (2011) Cdk1 phosphorylation of the kinetochore protein Nsk1 prevents error-prone chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **195**, 583-593.

Chen S., Bohrer L. R., Rai A. N., Pan Y., Gan L., Zhou X., Bagchi A., Simon J. A., Huang H. (2010) Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1108-1114.

Chen X. - Y., Gu X. - T., Saiyin H., Wan B., Zhang Y. - J., Li J., Wang Y. - L., Gao R., Wang Y. - F., Dong W. - P., Najjar S. M., Zhang C. - Y., Ding H. - F., Liu J. O., Yu L. (2012) Brain-selective kinase 2 (BRSK2) phosphorylation on PCTAIRE1 negatively regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 30368-30375.

Chen X., Liao Y., Long D., Yu T., Shen F., Lin X. (2017) The Cdc2/Cdk1 inhibitor, purvalanol A, enhances the cytotoxic effects of taxol through Op18/stathmin in non-small cell lung cancer cells in vitro. *Int. J. Mol. Med.* **40**, 235-242.

Chen Y. - J., Dominguez-Brauer C., Wang Z., Asara J. M., Costa R. H., Tyner A. L., Lau L. F., Raychaudhuri P. (2009) A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1. *J. Biol. Chem.* **284**, 30695-30707.

Cheng S. - W. G., Kuzyk M. A., Moradian A., Ichu T. - A., Chang V. C. - D., Tien J. F., Vollett S. E., Griffith M., Marra M. A., Morin G. B. (2012) Interaction of cyclin-dependent kinase 12/CrkRS with cyclin K1 is required for the phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4691-4704.

Cheung Z. H., Ip N. Y. (2012) Cdk5: A multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell. Biol.* **22**, 169-175.

Child E. S., Hendrychová T., McCague K., Futreal A., Otyepka M., Mann D. J. (2010) A cancer-derived mutation in the PSTAIRE helix of cyclin-dependent kinase 2 alters the stability of cyclin binding. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**, 858-864.



Choi H. K., Curhan G. (2007) Coffee, tea, and caffeine consumption and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum.* **57**, 816-821.

Choi Y. J., Anders L. (2014) Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene.* **33**, 1890-1903.

Chu C. K., Suh J. J., Mesbah M., Cutler S. J. (1986) Ring transformation reactions of C-nucleosides: Facile synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine and pyrazolo[1,5-a]triazine C-nucleosides. *J. Het. Chem.* **23**, 349-352.

Ibarra A., Schwob E., Méndez J. (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8956-8961.

Iizuka D., Inanami O., Kashiwakura I., Kuwabara M. (2007) Purvalanol A enhances cell killing by inhibiting up-regulation of CDC2 kinase activity in tumor cells irradiated with high doses of X rays. *Radiat. Res.* **167**, 563-571.

Iizuka D., Ogura A., Kuwabara M., Inanami O. (2008) Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II. *Anticancer Drugs.* **19**, 565-572.

Infante J. R., Cassier P. A., Gerecitano J. F., Witteveen P. O., Chugh R., Ribrag V., Chakraborty A., Matano A., Dobson J. R., Crystal A. S., Parasuraman S., Shapiro G. I. (2016) A phase i study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5696-5705.

Iorns E., Turner N. C., Elliott R., Syed N., Garrone O., Gasco M., Tutt A. N. J., Crook T., Lord C. J., Ashworth A. (2008) Identification of CDK10 as an Important Determinant of Resistance to Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Cancer Cell.* **13**, 91-104.

Iwata H., Im S. A., Masuda N., Im Y. H., Inoue K., Rai Y., Nakamura R., Kim J. H., Hoffman J. T., Zhang K., Giorgetti C., Iyer S., Schnell P. T., Bartlett C. H., Ro J. (2017) PALOMA-3: phase iii trial of fulvestrant with or without palbociclib

in premenopausal and postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer that progressed on prior endocrine therapy-safety and efficacy in asian patients. *J. Glob. Oncol.* **3**, 289-303.

Jackman M., Lindon C., Nigg E. A., Pines J. (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* **5**, 143-148.

Jackson E. K., Gillespie D. G., Mi Z., Cheng D., Bansal R., Janesko-Feldman K., Kochanek P. M. (2014) Role of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the renal 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **307**, F14-24.

Jagoda E., Contoreggi C., Lee M. J., Kao C. H., Szajek L. P., Listwak S., Gold P., Chrousos G., Greiner E., Kim B. M., Jacobson A. E., Rice K. C., Eckelman W. (2003) Autoradiographic visualization of corticotropin releasing hormone type 1 receptors with a nonpeptide ligand: synthesis of [(76)Br]MJL-1-109-2. *J. Med. Chem.* **46**, 3559-3562.

Jain P., Flaherty P. T., Yi S., Chopra I., Bleasdel G., Lipay J., Ferandin Y., Meijer L., Madura J. D. (2011) Design, synthesis, and testing of an 6-O-linked series of benzimidazole based inhibitors of CDK5/p25. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 359-373.

Jeffrey P. D., Tong L., Pavletich N. P. (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes. Dev.* **14**, 3115-3125.

Jessen B. A., Lee L., Koudriakova T., Haines M., Lundgren K., Price S., Nonomiya J., Lewis C., Stevens G. J. (2007) Peripheral white blood cell toxicity induced by broad spectrum cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Appl. Toxicol.* **27**, 133-142.

Johannes J. W., Denz C. R., Su N., Wu A., Impastato A. C., Mlynarski S., Varnes J. G., Prince D. B., Cidado J., Gao N., Haddrick M., Jones N. H., Li S., Li X., Liu Y., Nguyen T. B., O'Connell N., Rivers E., Robbins D. W., Tomlinson R., Yao T., Zhu X., Ferguson A. D., Lamb M. L., Manchester J. I., Guichard S. (2018) Structure-based design of selective noncovalent CDK12 inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **13**, 231-235.

Jorda R., Havlíček L., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Voller J., Sturc A., Navrátilová J., Kuzma M., Mistrík M., Bártek J., Strnad M., Kryštof V.

(2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J. Med. Chem.* **54**, 2980-2993.

Jorda R., Paruch K., Kryštof V. (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 2974-2980.

Junien J. L., Guillaume M., Lakatos C., Sterne J. (1981) Bronchodilator and antiallergic properties of LA 2851 (2-4-diamino-7-methyl-pyrazolo (1,5-a) 1,3,5-triazine). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **252**, 313-326.

Junien J. L., Lakatos C., Brohon J., Guillaume M., Sterne J. (1982) Anti-inflammatory effect of LA 2851 and reference drugs on some models of inflammation. Investigation of the mechanism of action. *Agents Actions.* **12**, 459-465.

Kaldis P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): From yeast to mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 284-296.

Kaneko S., Li G., Son J., Xu C. - F., Margueron R., Neubert T. A., Reinberg D. (2010) Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes. Dev.* **24**, 2615-2620.

Karp J. E., Smith B. D., Resar L. S., Greer J. M., Blackford A., Zhao M., Moton-Nelson D., Alino K., Levis M. J., Gore S. D., Joseph B., Carraway H., McDevitt M. A., Bagain L., Mackey K., Briel J., Doyle L. A., Wright J. J., Rudek M. A. (2011) Phase 1 and pharmacokinetic study of bolus-infusion flavopiridol followed by cytosine arabinoside and mitoxantrone for acute leukemias. *Blood.* **117**, 3302-3310.

Keravis T., Lugnier C. (2012) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 1288-1305.

Kim D. C., Lee Y. R., Yang B. S., Shin K. J., Kim D. J., Chung B. Y., Yoo K. H. (2003) Synthesis and biological evaluations of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as cyclin-dependent kinase 2inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 525-532.

- Kim J. K., Diehl J. A. (2009) Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* **220**, 292-296.
- Kim S., Loo A., Chopra R., Caponigro G., Huang A., Vora S., Parasuraman S., Howard S., Keen N., Sellers W., Brain C. (2014) Abstract PR02: LEE011: An orally bioavailable, selective small molecule inhibitor of CDK4/6-reactivating Rb in cancer. *Mol. Cancer Ther.* **12**, PR02.
- Kitada S., Zapata J. M., Andreeff M., Reed J. C. (2000) Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **96**, 393-397.
- Knockaert M., Gray N., Damiens E., Chang Y. T., Grellier P., Grant K., Fergusson D., Mottram J., Soete M., Dubremetz J. F., Le Roch K., Doerig C., Schultz P., Meijer L. (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem. Biol.* **7**, 411-422.
- Knockaert M., Lenormand P., Gray N., Schultz P., Pouyssegur J., Meijer L. (2002) p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene.* **21**, 6413-6424.
- Kobe J., Robins R. K., O'Brien D. E. (1974) The synthesis and chemical reactions of certain pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines. *J. Het. Chem.* **11**, 199-204.
- Kohoutek J., Blazek D. (2012) Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell. Div.* **7**, 12.
- Kornev A. P., Taylor S. S. (2010) Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 440-444.
- Kouroukis C. T., Belch A., Crump M., Eisenhauer E., Gascoyne R. D., Meyer R., Lohmann R., Lopez P., Powers J., Turner R., Connors J. M. (2003) Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1740-1745.
- Kozar K., Sicinski P. (2005) Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle.* **4**, 388-391.

Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3283-3286.

Kryštof V., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Fischer P. M., Müller P., Vojtesek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1763-1771.

Kryštof V., Moravcová D., Paprskářová M., Barbier P., Peyrot V., Hlobilková A., Havlíček L., Strnad M. (2006) Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-d]pyrimidine analogues of myoseverin. *Eur. J. Med. Chem.* **41**, 1405-1411.

Kumar S. K., LaPlant B., Chng W. J., Zonder J., Callander N., Fonseca R., Fruth B., Roy V., Erlichman C., Stewart A. K. (2015) Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood.* **125**, 443-448.

Labbe J. C., Capony J. P., Caput D., Cavadore J. C., Derancourt J., Kaghad M., Lelias J. M., Picard A., Doree M. (1989b) MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* **8**, 3053-3058.

Labbe J. C., Lee M. G., Nurse P., Picard A., Doree M. (1988) Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc<sup>2+</sup>*. *Nature.* **335**, 251-254.

Labbe J. C., Picard A., Peaucellier G., Cavadore J. C., Nurse P., Doree M. (1989a) Purification of MPF from starfish: Identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell.* **57**, 253-263.

Lallena M. J., Boehnke K., Torres R., Hermoso A., Amat J., Calsina B., De Dios A., Buchanan S., Du J., Beckmann R. P., Gong X., McNulty A. (2015) In-vitro characterization of Abemaciclib pharmacology in ER+ breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **75**, 3101.

Lavoie G., St-Pierre Y. (2011) Phosphorylation of human DNMT1: Implication of cyclin-dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 187-192.

- Law M. E., Corsino P. E., Narayan S., Law B. K. (2015) Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Molecular Pharmacology*. **88**, 846-852.
- Le Breton M., Bellé R., Cormier P., Mulner-Lorillon O., Morales J. (2003) M-phase regulation of the recruitment of mRNAs onto polysomes using the CDK1/cyclin B inhibitor aminopurvalanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 880-886.
- Le Tourneau C., Faivre S., Laurence V., Delbaldo C., Vera K., Girre V., Chiao J., Armour S., Frame S., Green S. R., Gianella-Borradori A., Diéras V., Raymond E. (2010) Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur. J. Cancer*. **46**, 3243-3250.
- Lee M. G., Nurse P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. **327**, 31-35.
- Li L., Wang J., Hou J., Wu Z., Zhuang Y., Lu M., Zhang Y., Zhou X., Li Z., Xiao W., Zhang W. (2012) Cdk1 interplays with Oct4 to repress differentiation of embryonic stem cells into trophectoderm. *FEBS Lett.* **586**, 4100-4107.
- Li S., MacLachlan T. K., de Luca A., Claudio P. P., Condorelli G., Giordano A. (1995) The *cdc-2*-related kinase, PISSLRE, is essential for cell growth and acts in G2 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* **55**, 3992-3995.
- Lilja L., Yang S. - N., Webb D. - L., Juntti-Berggren L., Berggren P. - O., Bark C. (2001) Cyclin-dependent Kinase 5 Promotes Insulin Exocytosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 34199-34205.
- Lim F. P. L., Luna G., Dolzhenko A. V. (2014) A new, one-pot, multicomponent synthesis of 5-aza-9-deaza-adenines under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*. **55**, 5159-5163.
- Lim S., Kaldis P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. **140**, 3079-3093.
- Lin T. S., Ruppert A. S., Johnson A. J., Fischer B., Heerema N. A., Andritsos L. A., Blum K. A., Flynn J. M., Jones J. A., Hu W., Moran M. E., Mitchell S. M., Smith L.

- L., Wagner A. J., Raymond C. A., Schaaf L. J., Phelps M. A., Villalona-Calero M. A., Grever M. R., Byrd J. C. (2009) Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6012-6018.
- Liu J., Kipreos E. T. (2000) Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1061-1074.
- Liu Y., Cheng K., Gong K., Fu A. K., Ip N. Y. (2006) Pctaire1 phosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: implications in the regulation of its hexamerization and exocytosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 9852-9858.
- Ljungman M., Paulsen M. T. (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol. Pharmacol.* **60**, 785-789.
- Lohka M. J., Hayes M. K., Maller J. L. (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 3009-3013.
- Lolli G. (2010) Structural dissection of cyclin dependent kinases regulation and protein recognition properties. *Cell Cycle.* **9**, 1551-1561.
- López-Tarruella S., Jerez Y., Márquez-Rodas I., Echavarria I., Martin M. (2017) Ribociclib for the treatment of advanced hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Future Oncol.* **13**, 2137-2149.
- Losiewicz M. D., Carlson B. A., Kaur G., Sausville E. A., Worland P. J. (1994) Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 589-595.
- Lu Y., Wu Y., Feng X., Shen R., Wang J. H., Fallahi M., Li W., Yang C., Hankey W., Zhao W., Ganju R. K., Li M. O., Cleveland J. L., Zou X. (2014) CDK4 deficiency promotes genomic instability and enhances Myc-driven lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* **124**, 1672-1684.

- Lübbers T., Angehrn P., Gmünder H., Herzig S., Kulhanek J. (2000) Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of ATP analogues as DNA gyrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 821-826.
- Ma Z., Wu Y., Jin J., Yan J., Kuang S., Zhou M., Zhang Y., Guo A. Y. (2013) Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **66**, 1002-1010.
- Maćkowiak M., Kolasiewicz W., Markowicz-Kula K., Wedzony K. (2005) Purvalanol A, inhibitor of cyclin-dependent kinases attenuates proliferation of cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Pharmacol. Rep.* **57**, 845-849.
- Maďarová J., Lukešová M., Hlobilková A., Strnad M., Vojtěšek B., Lenobel R., Hajdúch M., Murray P. G., Perera S., Kolář Z. (2002) Synthetic inhibitors of CDKs induce different responses in androgen sensitive and androgen insensitive prostatic cancer cell lines. *Mol. Pathol.* **55**, 227-234.
- Maiuolo J., Oppedisano F., Gratteri S., Muscoli C., Mollace V. (2016) Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int. J. Cardiol.* **213**, 8-14.
- Malumbres M. (2014) Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology.* **15**, 122.
- Malumbres M., Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630-641.
- Malumbres M., Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 153-166.
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **298**, 1912-1934.
- Mapelli M., Massimiliano L., Crovace C., Seeliger M. A., Tsai L. - H., Meijer L., Musacchio A. (2005) Mechanism of Cdk5/P25 binding by Cdk inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**, 671.
- Marais A., Ji Z., Child E. S., Krause E., Mann D. J., Sharrocks A. D. (2010) Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK-cyclin complexes. *J. Biol. Chem.* **285**, 35728-35739.



- Matsuda S., Kominato K., Koide-Yoshida S., Miyamoto K., Isshiki K., Tsuji A., Yuasa K. (2014) PCTAIRE kinase 3/cyclin-dependent kinase 18 is activated through association with cyclin A and/or phosphorylation by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **289**, 18387-18400.
- Matsugi M., Hashimoto K., Inai M., Fukuda N., Furuta T., Minamikawa J., Otsuka S. (1995) Asymmetric synthesis of a xanthine dehydrogenase inhibitor (S)-(-)-BOF-4272: Utility of chiral alkoxysulfonium salts. *Tetrahedron: Asymmetry*. **6**, 2991-3000.
- McElroy J. F., Ward K. A., Zeller K. L., Jones K. W., Gilligan P. J., He L., Lelas S. (2002) The CRF(1) receptor antagonist DMP696 produces anxiolytic effects and inhibits the stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation without sedation or ataxia in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **165**, 86-92.
- McGowan C. H., Russell P. (1993) Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12**, 75-85.
- Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J. P., Blow J. J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J. G., Moulinoux J. P. (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **243**, 527-536.
- Mejdrová I., Chalupská D., Kögler M., Šála M., Plačková P., Baumlová A., Hřebabecký H., Procházková E., Dejmek M., Guillon R., Strunin D., Weber J., Lee G., Birkus G., Mertlíková-Kaiserová H., Boura E., Nencka R. (2015) Highly selective phosphatidylinositol 4-kinase III $\beta$  inhibitors and structural insight into their mode of action. *J. Med. Chem.* **58**, 3767-3793.
- Mikolcevic P., Sigl R., Rauch V., Hess M. W., Pfaller K., Barisic M., Pelliniemi L. J., Boesl M., Geley S. (2012) Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 868-879.
- Mita M. M., Joy A. A., Mita 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. *Clin. Breast Cancer*. **14**, 169-176.

- Mohapatra S., Chu B., Wei S., Djeu J., Epling-Burnette P. K., Loughran T., Jove R., Pledger W. J. (2003) Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2. *Cancer Res.* **63**, 8523-8530.
- Monaco E. A. 3rd., Beaman-Hall C. M., Mathur A., Vallano M. L. (2004) Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1947-1964.
- Moravcová D., Kryštof V., Havlíček L., Moravec J., Lenobel R., Strnad M. (2003) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 2989-2992.
- Morelli X., Bourgeas R., Roche P. (2011) Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 475-481.
- Morgan D. O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* **374**, 131-134.
- Morgan D. O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-291.
- Naik R. G., Kattige S. L., Bhat S. V., Alreja B., de Souza N. J., Rupp R. H. (1988) An antiinflammatory cum immunomodulatory piperidiny-benzopyranone from *dysoxylum binectariferum*: isolation, structure and total synthesis. *Tetrahedron.* **44**, 2081-2086.
- Naito S., Nishimura M., Tamao Y. (2000) Evaluation of the pharmacological actions and pharmacokinetics of BOF-4272, a xanthine oxidase inhibitor, in mouse liver. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 173-179.
- Napolitano G., Licciardo P., Gallo P., Majello B., Giordano A., Lania L. (1999) The CDK9-associated cyclins T1 and T2 exert opposite effects on HIV-1 Tat activity. *AIDS.* **13**, 1453-1459.
- Nemunaitis J. J., Small K. A., Kirschmeier P., Zhang D., Zhu Y., Jou Y. - M., Statkevich P., Yao S. - L., Bannerji R. (2013) A first-in-human, phase 1, dose-

escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *J. Transl. Med.* **11**, 259.

Nie Z., Perretta C., Erickson P., Margosiak S., Almassy R., Lu J., Averill A., Yager K. M., Chu S. (2007) Structure-based design, synthesis, and study of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4191-4195.

Nie Z., Perretta C., Erickson P., Margosiak S., Lu J., Averill A., Almassy R., Chu S. (2008) Structure-based design and synthesis of novel macrocyclic pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine compounds as potent inhibitors of protein kinase CK2 and their anticancer activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 619-623.

Nikolic M., Dudek H., Kwon Y. T., Ramos Y. F., Tsai L. H. (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* **10**, 816-825.

Novinson T., Senga K., Kobe J., Robins R. K., O'Brien D. E., Albert A. A. (1974) Synthesis of unsymmetrical 2,4-dialkylpyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines. *J. Het. Chem.* **11**, 691-695.

Nurse P. (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature.* **256**, 547-551.

Nurse, P. (2000) The incredible life and times of biological cells. *Science.* **289**, 1711-1716.

O'Brien N. A., Tomaso E. D., Ayala R., Tong L., Issakhanian S., Linnartz R., Finn R. S., Hirawat S., Slamon D. J. (2014) Abstract 4756: In vivo efficacy of combined targeting of CDK4/6, ER and PI3K signaling in ER+ breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 4756.

Okamoto K., Nishino T. (1995) Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor. *J. Biol. Chem.* **270**, 7816.

Ou C. - Y., Poon V. Y., Maeder C. I., Watanabe S., Lehrman E. K., Fu A. K. Y., Park M., Fu W. - Y., Jorgensen E. M., Ip N. Y., Shen K. (2010) Two cyclin-dependent

kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell*. **141**, 846-858.

Pagliaro L., Felding J., Audouze K., Nielsen S. J., Terry R. B., Krog-Jensen C., Butcher S. (2004) Emerging classes of protein-protein interaction inhibitors and new tools for their development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 442-449.

Papřskářová M., Kryštof V., Jorda R., Dzubák P., Hajdúch M., Wesierska-Gadek J., Strnad M. (2009) Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclindependent kinase inhibitor roscovitine. *J. Cell Biochem.* **107**, 428-437.

Park M. H., Kim S. Y., Kim Y. J., Chung Y. H. (2014) ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 129-134.

Park M., Watanabe S., Poon V. Y. N., Ou C. - Y., Jorgensen E. M., Shen K. (2011) CYY-1/cyclin Y and CDK-5 differentially regulate synapse elimination and formation for rewiring neural circuits. *Neuron*. **70**, 742-757.

Park S. - U., Chung S. K., Newcomb M. (1986) Acceptor, donor, and captodative stabilization in transition states of 5-hexen-1-yl radical cyclizations. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 240-244.

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) Dinaciclub (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2344-2353.

Paruch K., Dwyer M. P., Alvarez C., Brown C., Chan T. Y., Doll R. J., Keertikar K., Knutson C., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fischmann T., Hruza A., Madison V., Nomeir A. A., Wang Y., Kirschmeier P., Lees E., Parry D., Sgambellone N., Seghezzi W., Schultz L., Shanahan F., Wiswell D., Xu X., Zhou Q., James R. A., Paradkar V. M., Park H., Rokosz L. R., Stauffer T. M., Guzi T. J. (2010) Discovery of Dinaciclub (SCH 727965): a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 204-208.

Patani G. A., LaVoie E. J. (1996) Bioisosterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.* **96**, 3147-3176.

Patnaik A., Rosen L. S., Tolaney S. M., Tolcher A. W., Goldman J. W., Gandhi L., Papadopoulos K. P., Beeram M., Rasco D. W., Myrand S. P., Kulanthaivel P., Andrews J. M., Frenzel M., Cronier D., Chan E. M., Flaherty K., Wen P. Y., Shapiro G. (2014) LY2835219, a novel cell cycle inhibitor selective for CDK4/6, in combination with fulvestrant for patients with hormone receptor positive (HR+) metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **32**, 534.

Pavletich N. P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821-828.

Pérez de Castro I., de Cárcer G., Malumbres M. (2007) A census of mitotic cancer genes: New insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis.* **28**, 899-912.

Phelps M. A., Lin T. S., Johnson A. J., Hurh E., Rozewski D. M., Farley K. L., Wu D., Blum K. A., Fischer B., Mitchell S. M., Moran M. E., Brooker-McEldowney M., Heerema N. A., Jarjoura D., Schaaf L. J., Byrd J. C., Grever M. R., Dalton J. T. (2009) Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **113**, 2637-2645.

Phoomvuthisarn P., Cross A., Glennon-Alty L., Wright H. L., Edwards S. W. (2018) The CDK inhibitor purvalanol a induces neutrophil apoptosis and increases the turnover rate of Mcl-1: potential role of p38-MAPK in regulation of Mcl-1 turnover. *Clin. Exp. Immunol.* **192**, 171-180.

Quereda V., Porlan E., Cañamero M., Dubus P., Malumbres M. (2016) An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death Differ.* **23**, 430-441.

Raboisson P., Baurand A., Cazenave J. - P., Gachet C., Schultz D., Spiess B., Bourguignon J. - J. (2002a) General approach toward the synthesis of C-nucleoside pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines and their 3' ,5' - bisphosphate C-nucleotide analogues

as the first reported in vivo stable P2Y1-receptor antagonists. *J. Org. Chem.* **67**, 8063-8071.

Raboisson P., Schultz D., Muller C., Reimund J. - M., Pinna G., Mathieu R., Bernard P., Do Q. – T., DesJarlais R. L., Justiano H., Lugnier C., Bourguignon J. - J. (2008) Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 inhibitors: evaluation of pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine ring system as an adenine bioisostere. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 816-829.

Raboisson P., Baurand A., Cazenave J. P., Gachet C., Retat M., Spiess B., Bourguignon J. J. (2002b) Novel antagonists acting at the P2Y(1) purinergic receptor: synthesis and conformational analysis using potentiometric and nuclear magnetic resonance titration techniques. *J. Med. Chem.* **45**, 962-972.

Rader J. A., Russell M. R., Hart L. S., Nakazawa M. S., Belcastro L. T., Martinez D., Li Y., Carpenter E. L., Attiyeh E. F., Diskin S. J., Kim S., Parasuraman S., Caponigro G., Schnepf R. W., Wood A. C., Pawel B., Cole K. A., Maris J. M. (2013) Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6173-6182.

Raje N., Kumar S., Hideshima T., Roccaro A., Ishitsuka K., Yasui H., Shiraishi N., Chauhan D., Munshi N. C., Green S. R., Anderson K. C. (2005) Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood.* **106**, 1042-1047.

Ramya P. V. S., Guntuku L., Angapelly S., Digwal C. S., Lakshmi U. J., Sigalapalli D. K., Babu B. N., Naidu V. G. M., Kamal A. (2018) Synthesis and biological evaluation of curcumin inspired imidazo[1,2-a]pyridine analogues as tubulin polymerization inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **143**, 216-231.

Rapella A., Negrioli A., Melillo G., Pastorino S., Varesio L., Bosco M. C. (2002) Flavopiridol inhibits vascular endothelial growth factor production induced by hypoxia or picolinic acid in human neuroblastoma. *J. Cancer.* **99**, 658-664.

Raynaud F. I., Whittaker S. R., Fischer P. M., McClue S., Walton M. I., Barrie S. E., Garrett M. D., Rogers P., Clarke S. J., Kelland L. R., Valenti M., Brunton L., Eccles S., Lane D. P., Workman P. (2005) In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent

kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin. Cancer. Res.* **11**, 4875-4887.

Ren S., Rollins B. J. (2004) Cyclin C/Cdk3 Promotes Rb-Dependent G0 Exit. *Cell.* **117**, 239-251.

Richardson C. M., Williamson D. S., Parratt M. J., Borgognoni J., Cansfield A. D., Dokurno P., Francis G. L., Howes R., Moore J. D., Murray J. B., Robertson A., Surgenor A. E., Torrance C. J. (2006) Triazolo[1,5-a]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: protein structure-guided design and SAR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 1353-1357.

Robins R. K., Revankar G. R., O'Brien D. E., Springer R. H., Novinson T., Albert A., Senga K., Miller J. P., Streeter D. G. (1985) Purine analog inhibitors of xanthine oxidase-structure activity relationships and proposed bindings of molybdenum cofactor. *J. Heterocyclic Chem.* **22**, 601-634.

Rosato R. R., Almenara J. A., Yu C., Grant S. (2004) Evidence of a functional role for p21WAF1/CIP1 down-regulation in synergistic antileukemic interactions between the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate and flavopiridol. *Mol. Pharmacol.* **65**, 571-581.

Rostam M. A., Shajimoon A., Kamato D., Mitra P., Piva T., Getachew R., Cao Y., Zheng W., Osman N., Little P. J. (2018) Flavopiridol inhibits TGF- $\beta$ -stimulated biglycan synthesis by blocking linker region phosphorylation and nuclear translocation of Smad2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **365**, 156-164.

Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massagué J., Pavletich N. P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature.* **382**, 325-331.

Řezníčková E., Weitensteiner S., Havlíček L., Jorda R., Gucký T., Berka K., Bazgier V., Zahler S., Kryštof V., Strnad M. (2015) Characterization of a pyrazolo[4,3-d]pyrimidine inhibitor of cyclin-dependent kinases 2 and 5 and aurora A with pro-apoptotic and anti-angiogenic activity in vitro. *Chem. Biol. Drug. Des.* **86**, 1528-1540.

Saito T., Obitsu T., Minamoto C., Sugiura T., Matsumura N., Ueno S., Kishi A., Katsumata S., Nakai H., Toda M. (2011) Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines, triazolo[1,5-a]pyrimidines and their tricyclic derivatives as corticotropin-releasing factor 1 (CRF1) receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 5955-5966.

Salem M. A. I., Madkour H. M. F., Al Naimi I. S., Al-Qaradawi S. Y. (1993) "Study on 3,5-pyrazolidinedione and its derivatives. Part II". *J. Serb. Chem. Soc.* **58**,89-100.

Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., Caceres J. F., Dubus P., Malumbres M., Barbacid M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* **448**, 811-815.

Senderowicz A. M. (1999) Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest. New Drugs.* **17**, 313-320.

Senderowicz A. M., Sausville E. A. (2000) Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 376-387.

Senga K., Kobe J., Robins R. K., O'Brien D. E. (1975) Synthesis of 1,3-dialkylpyrazolo [1,5-a]-1,3,5-triazine-2,4-diones isomers of 1,3-dialkylxanthines. *J. Het. Chem.* **12**, 893-898.

Senga K., O'Brien D. E., Scholten M. B., Novinson T., Miller J. P., Robins R. K. (1982) Synthesis and enzymic activity of various substituted pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines as adenosine cyclic 3',5'-phosphate phosphodiesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **25**, 243-249.

Shah A., Bloomquist E., Tang S., Fu W., Bi Y., Liu Q., Yu J., Zhao P., Palmby T. R., Goldberg K. B., Chang C. J. G., Patel P., Alebachew E., Tilley A., Pierce W. F., Ibrahim A., Blumenthal G. M., Sridhara R., Beaver J. A., Pazdur R. (2018) FDA Approval: Ribociclib for the treatment of postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative advanced or metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* Publikováno online, dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2018/02/07/1078-0432.CCR-17-2369> (citováno 22. 4. 2018).



- Shapiro G. I. (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1770-1783.
- Sharma S., Bhatia M. S. (1989) Synthesis and Herbicidal Activity of  $\alpha$ -Cyanoalkylidene Acetamides. *J. Indian Chem. Soc.* **66**, 116-117.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes. Dev.* **13**, 1501-1512.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **18**, 2699-2711.
- Shimizu K., Uematsu A., Imai Y., Sawasaki T. (2014) Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion. *FEBS Lett.* **588**, 3030-3037.
- Schang L. M., Bantly A., Knockaert M., Shaheen F., Meijer L., Malim M. H., Gray N. S., Schaffer P. A. (2002) Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *J. Virol.* **76**, 7874-7882.
- Schulman B. A., Lindstrom D. L., Harlow E. (1998) Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10453-10458.
- Slater P. G., Gutierrez-Maldonado S. E., Gysling K., Lagos C. F. (2018) Molecular modeling of structures and interaction of human corticotropin-releasing factor (CRF) binding protein and CRF type-2 receptor. *Front. Endocrinol.* **9**, 43.
- Sledge G. W. Jr., Toi M., Neven P., Sohn J., Inoue K., Pivot X., Burdaeva O., Okera M., Masuda N., Kaufman P. A., Koh H., Grischke E. M., Frenzel M., Lin Y., Barriga S., Smith I. C., Bourayou N., Llombart-Cussac A. (2017) MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2875-2884.

Snouffer A., Brown D., Lee H., Walsh J., Lupu F., Norman R., Lechtreck K., Ko H. W., Eggenschwiler J. (2017) Cell Cycle-Related Kinase (CCRK) regulates ciliogenesis and Hedgehog signaling in mice. *PLOS Genetics*. **13**, e1006912.

Sonke G. S., Hart L. L., Campone M., Erdkamp F., Janni W., Verma S., Villanueva C., Jakobsen E., Alba E., Wist E., Favret A. M., Bachelot T., Hegg R., Wheatley-Price P., Souami F., Sutradhar S., Miller M., Germa C., Burris H. A. (2017) Efficacy and safety of ribociclib (LEE011) + letrozole in elderly patients with hormone receptor-positive (HR+), HER2-negative (HER2-) advanced breast cancer (ABC) in MONALEESA-2. *Eur. J. Cancer*. **72**, S1-S2.

Sroka I. M., Heiss E. H., Havlíček L., Totzke F., Aristei Y., Pechan P., Kubbutat M. H., Strnad M., Dirsch V. M. (2010) A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **77**, 255-261.

Staud F., Ceckova M., Micuda S., Pavek P. (2010) Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol. Biol.* **596**, 199-222.

Stephenson J. J., Nemunaitis J., Joy A. A., Martin J. C., Jou Y. M., Zhang D., Statkevich P., Yao S. L., Zhu Y., Zhou H., Small K., Bannerji R., Edelman M. J. (2014) Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **83**, 219-223.

Stevens M. F. G., Bliss E. A., Brown T. B., Mackenzie S. M. (1984) Triazines and related products. 29. Chemistry, DHFR-inhibitory activity and antitumour activity of substituted 2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. **19**, 375-379.

Strohmeyer T. W., Sliskovic D. R., Lang S. A., Lin Y. (1985) New synthesis of 2,4-dialkyl(or diaryl)pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines. *J. Het. Chem.* **22**, 7-10.

Sun B., Bachhawat P., Chu M. L., Wood M., Ceska T., Sands Z. A., Mercier J., Lebon F., Kobilka T. S., Kobilka B. K. (2017) Crystal structure of the adenosine A2A receptor

bound to an antagonist reveals a potential allosteric pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 2066-2071.

Sun L., Bera H., Chui W. K. (2013a) Synthesis of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as inhibitors of thymidine phosphorylase. *Eur. J. Med. Chem.* **65**, 1-11.

Sun L., Li J., Bera H., Dolzhenko A. V., Chiu G. N., Chui W. K. (2013b) Fragment-based approach to the design of 5-chlorouracil-linked-pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazines as thymidine phosphorylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **70**, 400-410.

Szilagyi Z., Gustafsson C. M. (2013) Emerging roles of Cdk8 in cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta*. **1829**, 916-920.

Takada Y., Aggarwal B. B. (2004) Flavopiridol inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloprotease-9. *J. Biol. Chem.* **279**, 4750-4759.

Takaki T., Echaliier A., Brown N. R., Hunt T., Endicott J. A., Noble M. E. (2009) The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 4171-4176.

Tam S. Y. K., Klein R. S., Wempen I., Fox J. J. (1979) Nucleosides. 112. Synthesis of some new pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines and their C-nucleosides. *J. Org. Chem.* **44**, 4547-4553.

Tang L., Li M. H., Cao P., Wang F., Chang W. R., Bach S., Reinhardt J., Ferandin Y., Galons H., Wan Y., Gray N., Meijer L., Jiang T., Liang D. C. (2005) Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J. Biol. Chem.* **280**, 31220-31229.

Temburnikar K. W., Ross C. R., Wilson G. M., Balzarini J., Cawrse B. M., Seley-Radtke K. L. (2015) Antiproliferative activities of halogenated pyrrolo[3,2-d]pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 4354-4363.

Tian C., Wang M., Han Z., Fang F., Zhang Z., Wang X., Liu J. (2007) Design, synthesis and biological evaluation of novel 6-substituted pyrrolo[3,2-d]pyrimidine analogues as antifolate antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 630-643.

Timofeev O., Cizmecioglu O., Settele F., Kempf T., Hoffmann I. (2010) Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* **285**, 16978-16990.

Tirado O. M., Mateo-Lozano S., Notario V. (2005) Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **65**, 9320-9327.

Tolaney S. M., Beeram M., Beck J. T., Conlin A. K., Dees E. C., Dickler M. N., Helsten T. L., Conkling P. R., Edenfield W. J., Richards D. A., Turner P. K., Cai N., Chan E. M., Pant S., Becerra C., Kalinsky K., Puhalla S., Rexer B. N., Burris H. A., Goetz M. P. (2015) A phase Ib study of abemaciclib with therapies for metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **33**, 522.

Tomashevski A., Webster D. R., Grammas P., Gorospe M., Kruman I. I. (2010) Cyclin-C-dependent cell-cycle entry is required for activation of non-homologous end joining DNA repair in postmitotic neurons. *Cell Death Differ.* **17**, 1189-1198.

Tudhope S. J., Wang C. - C., Petrie J. L., Potts L., Malcomson F., Kieswich J., Yaqoob M. M., Arden C., Hampson L. J., Agius L. (2012) A novel mechanism for regulating hepatic glycogen synthesis involving serotonin and cyclin-dependent kinase-5. *Diabetes.* **61**, 49-60.

Uematsu T., Nakashima M. (1994) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a novel xanthine oxidase inhibitor, BOF-4272, in healthy volunteers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 453-459.

Ullas G. V., Chu C. K., Ahn M. K., Kosugi Y. (1988) Synthesis of C-nucleoside analog of (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine and related acyclonucleosides. *J. Org. Chem.* **53**, 2413.

de La Haba G., Cantoni G. L. (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* **234**, 603-608.

Umei K., Nishigaya Y., Kondo A., Tatani K., Tanaka N., Kohno Y., Seto S. (2017) Novel pyrazolo[1,5-a]pyridines as orally active EP1 receptor antagonists: Synthesis, structure-activity relationship studies, and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 2635-2642.

Van Dross R., Browning P. J., Pelling J. C. (2006) Do truncated cyclins contribute to aberrant cyclin expression in cancer? *Cell Cycle*. **5**, 472-477.

Vesely J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771-786.

Villerbu N., Gaben A. - M., Redeuilh G., Mester J. (2002) Cellular effects of purvalanol A: A specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *Int. J. Cancer*. **97**, 761-769.

Vishwakarma J. N., Mofizuddin M., Ila H., Junjappa H. (1988) A facile synthesis of substituted 4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[3,4-d]pyrimidine and 1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[1,5-a]triazine derivatives. *J. Het. Chem.* **25**, 1387-1390.

Vymětalová L., Havlíček L., Štunc A., Skrášková Z., Jorda R., Pospíšil T., Strnad M., Kryštof V. (2006) 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2H)-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **110**, 291-301.

Wall N. R., O'Connor D. S., Plescia J., Pommier Y., Altieri D. C. (2003) Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* **63**, 230-235.

Wan A. S. C., Ngiam T. L., Leung S. L., Go M. L., Francisco C. G., Freire R., Hernandez R., Salazar J. A., Suarez E., Garcia G. A., Jimeno O., Noguez J. A. A., Acosta A. H., Vlahov R., Tarpanov V., Boshkova-Ljapova M., Milenkov B-, Stoilova V., Vlahov J., Snatzke G. (1983) Long-acting contraceptive agents: Levonorgestrel esters of unsaturated acids. *Steroids*. **41**, 339-348.

Wang H., Nicolay B. N., Chick J. M., Gao X., Geng Y., Ren H., Gao H., Yang G., Williams J. A., Suski J. M., Keibler M. A., Sicinska E.,

- Gerdemann U., Haining W. N., Roberts T. M., Polyak K., Gygi S. P., Dyson N. J., Sicinski P. (2017) The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*. **546**, 426-430.
- Wang S., Fischer P. M. (2008) Cyclin-dependent kinase 9: A key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 302-313.
- Wang X., Jia Y., Fei C., Song X., Li L. (2016) Activation/proliferation-associated protein 2 (caprin-2) positively regulates CDK14/Cyclin Y-mediated lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 (LRP5/6) constitutive phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **291**, 26427-26434.
- Wang Y., Yan H., Ma C., Lu D. (2015) Synthesis and anticancer activities of novel 8-azapurine carbocyclic nucleoside hydrazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 4461-4463.
- Wei Y., Chen Y. - H., Li L. - Y., Lang J., Yeh S. - P., Shi B., Yang C. - C., Yang J. - Y., Lin C. - Y., Lai C. - C., Hung M. C. (2011) CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat. Cell. Biol.* **13**, 87-94.
- Weitensteiner S. B., Liebl J., Kryštof V., Havlíček L., Gucký T., Strnad M., Fürst R., Vollmar A. M., Zahler S. (2013) Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors. *PLOS ONE*. **8**, e54607.
- Węsierska-Gądek J., Gritsch D., Zulehner N., Komina O., Maurer M. (2011) Roscovitine, a selective CDK inhibitor, reduces the basal and estrogen-induced phosphorylation of ER- $\alpha$  in human ER-positive breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **112**, 761-772.
- Whittaker S. R., Walton M. I., Garrett M. D., Workman P. (2004) The cyclindependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* **64**, 262-272.

Wohlbold L., Larochelle S., Liao J. C., Livshits G., Singer J., Shokat K. M., Fisher R. P. (2006) The cyclin-dependent kinase (CDK) family member PNQALRE/CCRK supports cell proliferation but has no intrinsic CDK-activating kinase (CAK) activity. *Cell Cycle*. **5**, 546-554.

Wood A. C., Krytska K., Ryles H. T., Infarinato N. R., Sano R., Hansel T. D., Hart L. S., King F. J., Smith T. R., Ainscow E., Grandinetti K. B., Tuntland T., Kim S., Caponigro G., He Y. Q., Krupa S., Li N., Harris J. L., Mossé Y. P. (2017) Dual ALK and CDK4/6 inhibition demonstrates synergy against neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2856-2868.

Wu S. C., Zhang Y. (2011) Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J. Biol. Chem.* **286**, 28511-28519.

Yang Y., Roine N., Mäkelä T. P. (2013) CCRK depletion inhibits glioblastoma cell proliferation in a cilium-dependent manner. *EMBO Rep.* **14**, 741-747.

Yeh C. W., Kao S. H., Cheng Y. C., Hsu L. S. (2013) Knockdown of cyclin-dependent kinase 10 (cdk10) gene impairs neural progenitor survival via modulation of raf1a gene expression. *J. Biol. Chem.* **288**, 27927-27939.

Yu D. S., Zhao R., 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 Rep.* **11**, 876-882.

Zhang J., Yang P. L., Gray N. S. (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 28-39.

Zhang S., Lu Z., Mao W., Ahmed A. A., Yang H., Zhou J., Jennings N., Rodriguez-Aguayo C., Lopez-Berestein G., Miranda R., Qiao W., Baladandayuthapani V., Li Z., Sood A. K., Liu J., Le X.-F., Bast R. C. Jr. (2015) CDK5 regulates paclitaxel sensitivity in ovarian cancer cells by modulating AKT activation, p21Cip1- and p27Kip1-mediated G1 cell cycle arrest and apoptosis. *PLOS ONE*. **10**, e0131833.

Zhang S., Ulrich M., Gromnicka A., Havlíček L., Kryštof V., Jorda R., Strnad M., Vollmar A. M., Zahler S. (2016) Anti-angiogenic effects of novel cyclin-dependent

kinase inhibitors with a pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine scaffold. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 2645-2656.

Zhang Y. X., Sicinska E., Czaplinski J. T., Remillard S. P., Moss S., Wang Y., Brain C., Loo A., Snyder E. L., Demetri G. D., Kim S., Kung A. L., Wagner A. J. (2014) Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2184-2193.

Zhao X., Feng D., Wang Q., Abdulla A., Xie X. - J., Zhou J., Sun Y., Yang E. S., Liu L. - P., Vaitheesvaran B., Bridges L., Kurland I. J., Strich R., Ni J. Q., Wang C., Ericsson J., Pessin J. E., Ji J. Y., Yang F. (2012) Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1. *J. Clin. Investig.* **122**, 2417-2427.

Zhao Y., Valdez G. R., Fekete E. M., Rivier J. E., Vale W. W., Rice K. C., Weiss F., Zorrilla E. P. (2007) Subtype-selective corticotropin-releasing factor receptor agonists exert contrasting, but not opposite, effects on anxiety-related behavior in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 846-854.

Zhu R., Lu X., Pradhan M., Armstrong S. P., Storchan G. B., Chow C. C., Simons S. S. Jr. (2014) A kinase-independent activity of Cdk9 modulates glucocorticoid receptor-mediated gene induction. *Biochemistry.* **53**, 1753-1767.

#### **Internetové databáze:**

COSMIC Database [online]: Dostupné z:

<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/> (citováno 1. 3. 2018).

#### **Patenty:**

Alvarez C. S., Chan T. - Y., Dillard L. W., Doll R. J., Dwyer M. P., Fischmann T. O., Girijavallabhan V. M., Guzi T. J., He Z. M., Hobbs D. W., James R. A., Keertikar K. M., Madison V., Mallams A., Paradkar V. M., Park H., Paruch K., Rivera J., Tran V. D. (2005) Pyrazolopyrimidine-derivatives as cyclin dependent kinase inhibitors. WO 2005077954 A3.



Arvanitis A. G., Chorvat R. J. (1998) Azolo triazines and pyrimidines. WO 1998003510 A1.

Boes M., Riemer C., Stadler H. (1999) Pyrazolopyrimidines and pyrazolotriazines with 5-HT<sub>6</sub> receptor affinity. EP 0941994 A1.

Caulkett P. W. R., Jones G., Collis M. G., Poucher S. M. (1991) Preparation of (amino)heteroaryl[1,2,4]triazolo[1,5-a]triazines and related compounds as adenosine A<sub>2</sub> receptor antagonists. EP 459702 A1.

Cohen C. (1979) Aminoderivate von pyrazol eckige klammer auf 1,5-a eckige klammer zu s-triazin, verfahren zu ihrer herstellung und sie enthaltende arzneimittel. DE 2900288 A1.

Darrow J. W., De Lombaert S., Blum C., Tran J., Giangiordano M., Griffith D. A., Carpino P. A. (2001) Certain alkylene diamine-substituted pyrazolo[1,5-a]-1,5-pyrimidines and pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines. WO 2001023387.

Darrow J. W., De Lombaert S., Blum C., Tran J., Giangiordano M., Griffith D. A., Carpino P. A. (2001) Amino substituted pyrazolo[1,5-a]-1,5-pyrimidines and pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines. WO 2001023388 A3.

Ghosh A., Wei L. (2006) Preparation of 3-amino-4,5-disubstituted-pyrazole derivatives. WO 2006131807 A1.

Gilligan P., Riley S. R., Meenan P. (2005) Salt and crystalline form thereof of a corticotropin releasing factor receptor antagonist. US 20050113375 A1.

Griffith D. A. (2004) Pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as cannabinoid receptor ligands. WO 2004069837 A1.

Griffith D. A. (2005) Pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-4-one derivatives as cb1 receptor antagonists. WO 2005049615 A1.

Guillemont J. E. G., Raboisson P. J. - M. B., Lounis N. (2012) Compounds with antibacterial activity against clostridium. WO 2012017030 A1.

Guzi T. J., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R. J., Girijavallabhan V. M., Dillard L. W., Tran V. D., He Z. M., James R. A., Park H. (2004) Pyrazolopyrimidines as cyclin dependent kinase inhibitors. WO 2004022560 A1.

Guzi T. J., Paruch K. (2005) Pyrazolotriazines as kinase inhibitors. WO 2005082908 A1.

Chesworth R., Moradel O. M., Shapiro G., Duncan K. W., Mitchell L. H., Jin L., Babine R. E. (2014) 1-phenoxy-3-(alkylamino)-propan-2-ol derivatives as *carml* inhibitors and uses thereof. WO 2014144455 A1.

Kiyokawa H., Yamada S., Miyajima K., Edamatsu K., Tatsumi K., Yamauchi T., Kishi K., Kiyono K. (1994) Condensed pyrazole derivatives, method of manufacturing the same, and androgen inhibitor. EP 594149.

Meijer L., Bettayeb K., Galons H., Demange L., Oumata N. (2009) Perharidines as cdk inhibitors. WO 2009034411.

Meijer L., Galons H., Joseph B., Popowycz F., Oumata N. (2010) Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine derivatives, preparation thereof, and therapeutic use thereof. WO 2010103486 A1.

Moravcová D., Havlíček L., Kryštof V., Lenobel R., Strnad M. (2003) Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidines, processes for their preparation and methods for therapy. WO 2003082872.

Alain L., Yannick R. (2015) Protein kinase inhibitors. WO 2015074135 A1.

Olson R. E., Fietze W. E. (1999) Pyrazolo[1,5-a]triazine corticotropin releasing factor antagonists. WO 1999067247 A1.

Su W. – G., Dai G., Xiao K., Jia H., Venable J. D., Bembenek S. D. (2014) Novel heteroaryl and heterocycle compounds, compositions and methods. WO 2014015675 A1.

Vaccaro W., Chen Z., Dodd D. S., Huynh T. N., Lin J., Liu C., Mussari C. P., Tokarski J., Tortolani D. R., Wroblewski S. T. (2007) Fused heterocyclic compounds useful as kinase modulators. US 2007078136 A1.

Venkatesan A. M. (1994) Angiotensin II receptor blocking 2,3-substituted pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazin-4(3H)-ones. US 5358947 A.

Vu C., Petter R. C., Kumaravel G. (2004) Triazolotriazines and pyrazolotriazines useful as a2a adenosine receptor antagonists. WO 2004092170 A2.

Westermann J., Krueger M., Arndt F., Rees R., Koetter C. (1988) 6,7-dihydro-(1,2,4) triazolo (1,5-a)(1,3,5) triazin-2-sulfonamides, process for their preparation and their use as agents with herbicidal and growth-regulating effective. DE 3644343 A1.

Wipf P., Meriney S. D., Liang M. (2014) Calcium channel agonists. WO 2014189830 A1.

Wolkerstorfer A., Szolar O., Handler N., Cusack S., Sauvaitre T., Simon C., Morice C., Giethlen B., Langer T., Smith M., So S. – S., Classen-Houben D., Buschmann H. (2013) 7-oxo-thiazolopyridine carbonic acid derivatives and their use in the treatment, amelioration or prevention of a viral disease. US 2013317022 A1.