

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Studium modifikací vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz
pro cílený biologický transport**

Autor: **Bc. Kristýna Hanáková**
Studijní obor: **N1407 Bioorganická chemie a chemická biologie**
Vedoucí práce: **RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.**
Rok: **2016**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady během příprav a zpracování předkládané diplomové práce. Dále děkuji RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. a Františku Škařupovi za pomoc při vykonávání syntetických postupů a celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Kristýna Hanáková

Název práce: Studium modifikací vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kináz pro cílený biologický transport

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Laboratoř růstových regulátorů

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt: Práce je zaměřena na syntézu konjugátů 2,6,9-trisubstituované purinové řady s polyaminy. Jedná se o inhibitory cyklin-dependentních kináz s potenciální zvýšenou selektivitou vůči nádorovým buňkám zprostředkovanou polyaminovým transportním systémem (PTS). Teoretická část je rešerší významu polyaminů, PTS, polyaminových analog a jejich využití v protinádorové léčbě. Experimentální část zahrnuje mnohastupňovou přípravu navržených cílových derivátů purinu, polyaminů a konečně také konjugátů.

Klíčová slova: polyaminy, polyaminový transport, polyaminová analoga, SLC, metabolismus polyaminů, regulace ODC, protinádorová aktivita

Počet stran: 96

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name

and surname: Bc. Kristýna Hanáková

Title: The study of selected cyclin-dependent kinase inhibitors for targeted delivery

Type of thesis: Master

Department: Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural research, Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: RNDr. Tomáš Gucký, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: This thesis is focused on synthesis of 2,6,9-trisubstituted purine conjugates with polyamines. These are inhibitors of cyclin-dependent kinases with potential enhanced selectivity against cancer cells mediated by polyamine transport system (PTS). Theoretical part is a summary of importance of polyamines, PTS, polyamine analogues and their utilization in anti-cancer therapy. Experimental part involves multistep synthesis of purine derivatives, polyamines and finally conjugates.

Keywords: polyamines, polyamine transport, polyamine analogues, SLC, polyamine metabolism, ODC regulation, anti-cancer activity

Number of pages: 96

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Teoretická část	10
3.1. Polyaminy.....	10
3.2. Metabolismus polyaminů	11
3.2.1. Biosyntéza polyaminů	11
3.2.2. Regulace metabolismu polyaminů.....	13
3.2.3. Polyaminy a buněčný růst.....	15
3.3. Polyaminový transportní systém (PTS)	16
3.3.1. Biochemie PTS.....	16
3.3.2. PTS a substrátová specifita	18
3.3.3. Vesikulární akumulace polyaminů	18
3.3.4. Transport polyaminů membránovými transportéry (MTs).....	20
3.4. Vybrané konjugáty polyaminů s chemoterapeutiky	23
3.5. Syntéza <i>N</i> -alkylovaných polyaminů, aminů a jejich analog	41
4. Diskuze a dosažené výsledky	46
4.1 Syntéza prekurzorů	46
4.1.1 Prekurzory benzylaminového typu	46
4.1.2. Prekurzory anilinového typu.....	49
4.1.3. Polyaminové prekurzory	51
4.1.4. Konjugáty	54
5. Experimentální část.....	59
5.1 Materiál a metody.....	59
5.2. Syntéza prekurzorů	60
5.2.1. Prekurzory benzylaminového typu	60
5.2.2. Prekurzory anilinového typu.....	69
5.2.3. Polyaminové prekurzory	72
5.3. Syntéza konjugátů.....	80
5.3.1. Konjugáty typu sekundárních aminů	80
5.3.2. Konjugáty typu amidů	86
6. Závěr.....	88
7. Seznam zkratk	89
8. Seznam použité literatury	91

1. Úvod

Jeden z hlavních problémů v protinádorové léčbě je nedostatečná selektivita chemoterapeutických látek vůči nádorovým buňkám vedoucí k nepříznivým vedlejším účinkům a systémové toxicitě¹. Klinická aplikace takových protinádorových činidel je proto omezena i přesto, že většina z nich vykazuje silnou protinádorovou aktivitu *in vitro*. Hlavní výzvou, které čelí řada výzkumných institucí je tedy snaha specificky cílit a eliminovat nádorové buňky, snížit vliv chemoterapeutika na zdravé buňky a co nejvíce omezit výskyt nežádoucích účinků. Převládající přístupy pro rozvoj specifických léčiv jsou založeny na cílení určité deregulované signální dráhy nebo overexprimovaného receptoru. Přestože u mnoha takových látek, včetně monoklonálních protilátek, peptidů, hormonů, či růstových faktorů byla prokázána vysoká selektivita vůči molekulárnímu cíli, jen málo z nich je užitečných v klinické terapii a to z důvodu jejich mírné protinádorové aktivity².

Potenciální alternativou se stal vývoj vektorových systémů se zvýšenou aktivitou vůči nádorovým buňkám skrze preferenční vychytávání takových látek buňkou. Tyto systémy mohou zvyšovat cytotoxicitu již zavedených chemoterapeutik³. Během několika posledních let byla vyvinuta řada konjugátů známých cytotoxických látek s polyaminy jako vektory s cílem využít upregulovaný polyaminový transportní systém (PTS) pro selektivní transport do nádorových buněk⁴. Přírodní polyaminy (putrescin, spermin a spermidin) jsou nezbytné pro mnoho funkcí v buňce a to včetně buněčné proliferace, diferenciace a přežití. Je dokázáno, že regulace obsahu polyaminů v intracelulárním prostoru je nutná pro normální růst buněk^{5,6}. V porovnání se zdravými buňkami mají nádorové buňky zvýšenou akumulaci polyaminů z důvodu zvýšeného vychytávání polyaminů z externích zdrojů⁷. Upregulace PTS v nádorových buňkách je stěžejním faktorem pro využití polyaminů jako vektorů pro selektivní transport cytotoxických chemoterapeutik, avšak nejdůležitější je, aby strukturní požadavky PTS umožňovaly transport polyaminových konjugátů. V současné době je známo, že PTS není omezen pouze na přírodní polyaminy, ale umožňuje přepravu také analog strukturně podobných přírodním polyaminům⁸.

Ve snaze připravit takovou látku, která by blokovala buněčný cyklus, způsobovala apoptózu a byla selektivní vůči nádorovým buňkám, pokračují v návaznosti na svou

bakalářskou práci ve vývoji nových modifikací inhibitorů cyklin-dependentních kináz s polyaminy jako vektory pro cílený transport. Inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou navrženy jako 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu. O látkách tohoto charakteru je již pojednáno v mé předchozí práci. Tato práce bude nyní v teoretické části více zaměřena na polyaminy, polyaminová analoga a polyaminový transportní systém, v experimentální části pak na syntézu jak inhibitorů cyklin-dependentních kináz, tak konjugátů těchto látek s příslušným polyaminem.

2. Cíle práce

Cílem práce byl vývin syntetických postupů vedoucích k vybraným konjugátům inhibitorů cyklin-dependentních kináz 2,6,9-trisubstituované purinové řady s polyaminy jako cíleně směřovaných látek do nádorových buněk. Teoretická část práce je zaměřena na aktualizaci poznatků o polyaminech a polyaminovém transportním systému včetně jejich využití v protinádorové léčbě.

Předmětem experimentální části práce je syntéza a purifikace navržených konjugátů, jejich charakterizace běžnými metodami organické strukturní analýzy a případně optimalizace syntetických postupů. Konjugáty byly navrženy jako 2-aminocykloalkyl-6-arylamino-9-cykloalkyl-9*H*-purinové nebo 2-aminocykloalkyl-6-heterobiarylamino-9-cykloalkyl-9*H*-purinové deriváty s vybraným polyaminem. Polyamin je vázán k příslušnému derivátu purinu jako amid nebo přímo jako sekundární amin.

3. Teoretická část

3.1. Polyaminy

Polyaminy jsou nízkomolekulární vysoce nabitě polykationty přítomné ve všech živých buňkách. Tyto látky se přirozeně vyskytují v prokaryotních a eukaryotních buňkách⁶. Mezi přirozené polyaminy, jež jsou syntetizovány u savců, patří spermin (Spm; N^1 , N^4 -bis(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin) a spermidin (Spd; N^1 -(3-aminopropyl)-1,4-butandiamin) vznikající z diaminu putrescinu (Put; 1,4-butandiamin)⁹. Agmatin (Agm; (4-aminobutyl)guanidin) není produkován savci¹⁰, ale je syntetizován rostlinami nebo bakteriemi intestinální mikroflóry. Proto je možné, že agmatin může být dodáván do savčího organismu z potravy či z mikroorganismů, ačkoliv existuje aktivní savčí agmatináza, která jej degraduje¹¹. Ukázalo se, že agmatin má povahu neurotransmiteru, nicméně fyziologická významnost této funkce nebyla potvrzena.

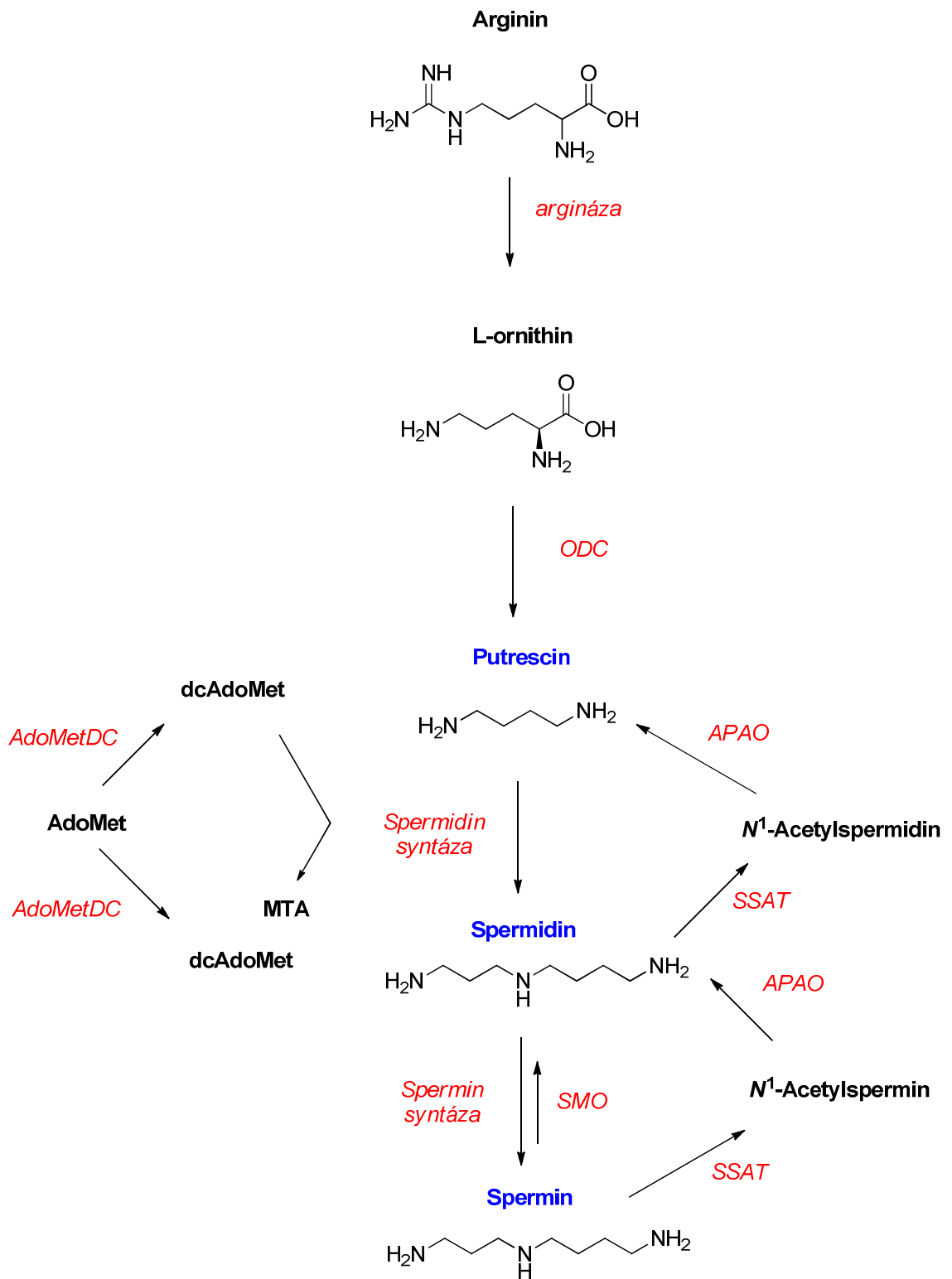
Bylo prokázáno, že se polyaminy účastní modulace struktury chromatinu, genové transkripce a translace, stabilizace DNA, signální transdukce, buněčného růstu, proliferace a migrace^{12,13}. Dále přispívají na interakcích mezi receptory a ligandy (např. spermin zvyšuje afinitu NMDA receptoru ke glycinu a snižuje afinitu receptoru v místě pro glutamátové antagonisty), na stabilitě buněčných membrán a funkci iontových kanálů. Vzhledem k jejich unikátnímu strukturnímu rysu v podobě pravidelně rozmístěných kladných nábojů vykonávají svou roli skrze iontové interakce¹².

Polyaminy jsou v buňkách přítomny v koncentracích v řádu jednotek až desítek mmol/l cytoplasmy¹⁴. Existuje rovnováha mezi polyaminy, které jsou vázány k různým molekulám polyanionického charakteru (zejména DNA a RNA)¹³ a polyaminy vyskytujícími se v nevázané formě¹⁵. Volné polyaminy představují asi 7-10 % z celkového obsahu polyaminů v buňce. Intracelulární polyaminy slouží k okamžitým buněčným potřebám a podléhají přísné regulaci¹². Jsou udržovány ve velmi úzkém rozmezí, protože pokles jejich koncentrace inhibuje buněčnou proliferaci, zatímco jejich přebytek je pro buňku toxický. Proto jsou volné polyaminy řízeny velmi rychlým, citlivým a přesným způsobem. Této regulace je dosaženo pomocí *de novo* syntézy, vzájemné přeměny, degradace a transportu¹⁶.

3.2. Metabolismus polyaminů

3.2.1. Biosyntéza polyaminů

Syntéza polyaminů probíhá v cytoplazmě buněk všech tkání. Aminokyselina ornithin je hlavním prekurzorem pro syntézu endogenních polyaminů. Ornithin je tvořen hydrolytickým štěpením aminokyseliny argininu za katalýzy enzymu arginázy¹⁷⁻¹⁹. U savců je ornithin dekarboxylován na putrescin enzymem ornithin dekarboxylázou (ODC). Tento enzym má významnou úlohu při udržování hladin polyaminů. ODC je často popisován jako rychlost určující krok při syntéze polyaminů, nicméně toto tvrzení je nepřesné. ODC je obvykle rychlost limitujícím faktorem v produkci putrescinu, ale pro syntézu vyšších polyaminů je vyžadována aminopropylová skupina, kterou poskytuje S-adenosylmethionin dekarboxyláza (AdoMetDC) tím, že dekarboxyluje S-adenosylmethionin (AdoMet) na S-adenosylmethioninamin, jenž je donorem aminopropylové skupiny (dcAdoMet). Spermidin syntáza pak převádí tuto aminopropylovou skupinu na putrescin, čímž dochází k tvorbě spermidinu. Spermin syntáza katalyzuje přenos další aminopropylové skupiny na spermidin, čímž je generován spermin^{12,20-23}. Spermidin a spermin syntáza patří do skupiny aminotransferáz. Navzdory jejich podobnosti v reaktivitě jsou tyto enzymy odlišné a substrátově specifické^{24,25}. Například spermidin syntáza se od spermin syntázy liší ve struktuře aktivního místa, kde má omezený prostor pro aminový substrát a je specifická pro putrescin. Obě aminotransferázy obsahují dva plně konzervované zbytky asparagové kyseliny, které hrají klíčovou roli v katalytickém mechanismu. Oba tyto enzymy jsou inhibovány 5'-methylthioadenosinem (MTA)²⁶. Biosyntéza polyaminů je reverzibilní, a tak spermin může být převeden zpět na spermidin či putrescin. Prvním krokem vzájemné přeměny je acetylace sperminu nebo spermidinu v pozici N^1 . To je katalyzováno enzymem spermin/spermidin acetyltransferázou (SSAT) využívající acetylCoA jako donor acetylové skupiny. Takto získaný acetylovaný polyamin následně podléhá oxidativnímu rozpadu pomocí acetylpolyamin oxidázy (APAO) a produkty této oxidace jsou spermidin či putrescin^{12,21}. Přeměna sperminu na spermidin může být mimo jiné také zprostředkována pomocí spermin oxidázy (SMO)²⁷. Přehledně jsou klíčové kroky biosyntézy endogenních polyaminů shrnuty na obr. č. 1.

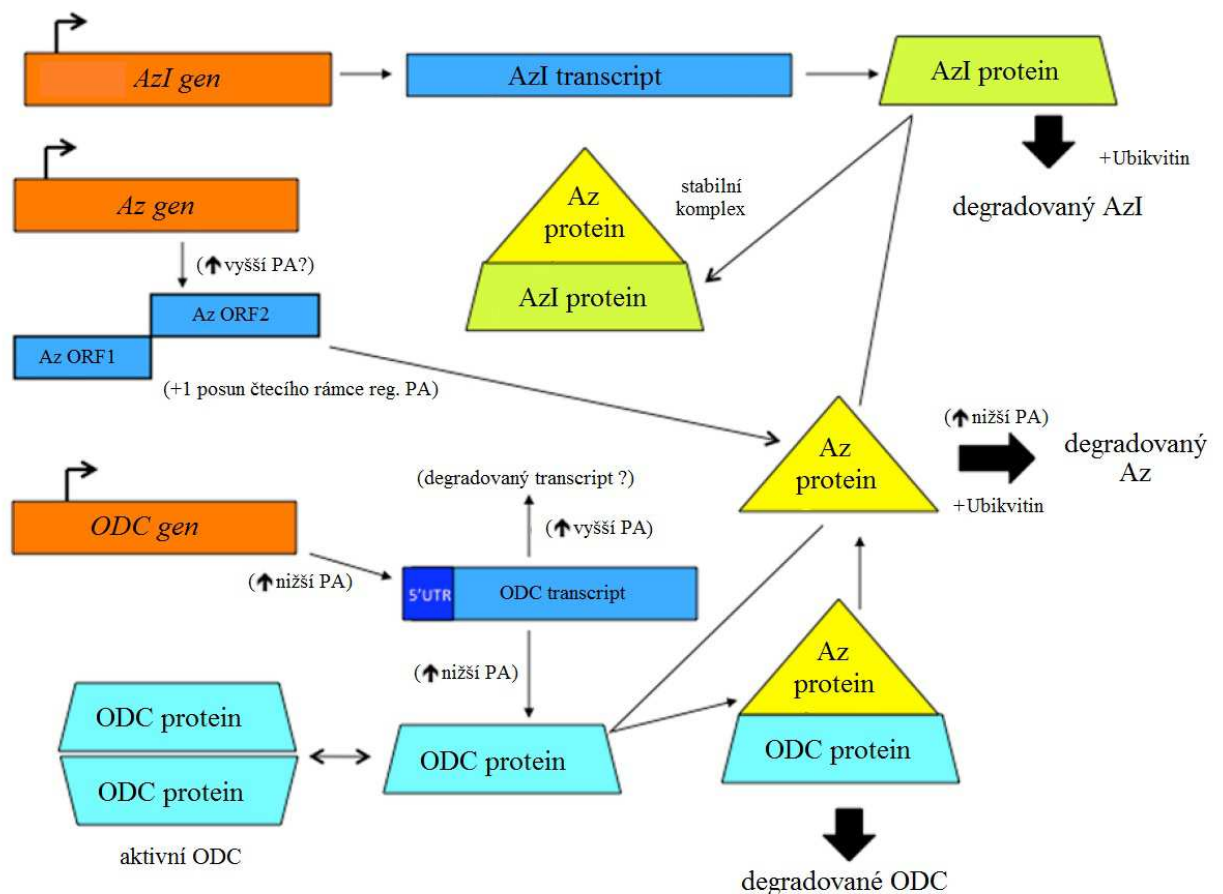


Obr. č.1: Struktura polyaminů, biosyntéza a vzájemná přeměna¹²

Enzymy jsou označeny červeně a kurzívou (*ODC*, *L*-ornithin dekarboxyláza; *AdoMetDC*, *A*-adenosylmethionin dekarboxyláza; *SMO*, spermin oxidáza; *SSAT*, spermidin/spermin-*N*¹-acetyltransferáza; *APAO*, acetylputrescin oxidáza).

3.2.2. Regulace metabolismu polyaminů

Prvním enzymem v průběhu polyaminové biosyntézy je ODC. Ornithin dekarboxyláza je regulována a patří do skupiny nejrychleji se degradujících proteinů v savčích buňkách. Degradace tohoto proteinu je regulována samotnými polyaminy a je nezávislá na ubikvitinu. Této degradaci je dosaženo skrze jedinečný mechanismus, ve kterém tzv. polyamin-indukovaný protein (antienzym, Az) váže a inaktivuje ODC a následně ji cílí k degradaci, jež probíhá na proteazomu (26S)²⁸. Az se podílí také na transportu polyaminů²⁹⁻³¹. K produkci polyamin-indukovaného proteinu je vyžadován unikátní ribozomální (+1) cílený posun čtecího rámce, což je regulováno polyaminy^{32,33}. Syntéza a funkce Az tedy tvoří zpětnou vazbu správné regulace a udržování polyaminové homeostázy. Dalším relevantním proteinem pro regulaci ODC a buněčného metabolismu polyaminů je antienzymový inhibitor (AzI). AzI vykazuje významnou homologii s ODC, ale postrádá ornithin-dekarboxylační aktivitu. Afinity Az k AzI je vyšší, než jeho afinita k samotné ODC, tedy AzI může způsobit uvolnění ODC z vazby na Az a zabránit tak jinak rychlé degradaci ODC. Na rozdíl od degradace ODC je degradace AzI ubikvitin-dependetní a je inhibována antienzymem Az³⁴. ODC aktivita je indukována během stimulace růstu buněk v klidové G₀ fázi a je zvyšována v buňkách transformovaných onkogeny či infikovaných viry. Regulace ODC je znázorněna na obr. č. 2.



Obr. č.2: *Regulace ODC*¹²

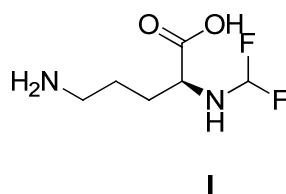
ODC je regulována polyaminy (PA) v úrovních transkripce, translace a proteinové stability a pravděpodobně je regulována také stabilitou transkriptu. Translace ODC je regulována pomocí 5'UTR. Pouze dimerní forma ODC je aktivní. Antienzymový protein (Az protein) zastává ústřední roli ve stabilitě enzymu ODC, protože se váže na ODC monomer a cílí jej k degradaci v proteozomu bez ubikvitinylace. Antienzym je poté uvolněn a může být recyklován a použit k další ODC degradaci. Syntéza Az je zvýšena pomocí vyšších hladin PA stimulací posunu čtecího rámce potřebného pro korektní translaci a také pravděpodobně zvýšenou transkripcí. Az je degradován v proteozomu po polyubikvitinylaci a úroveň degradace je zvýšena pomocí nízkých hladin PA. Antienzymový inhibitor (AzI) je inaktivní ODC paralog, který je ve formě monomeru a je degradován po polyubikvitinylaci. Váže se na Az a tvoří tak stabilní komplex, čímž brání rychlé ODC degradaci¹².

3.2.3. Polyaminy a buněčný růst

Buněčný růst je během buněčného cyklu mimo jiné regulován zvyšováním či snižováním koncentrace specifických proteinů a proteinových kináz známých jako cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK). Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou aktivovány specifickým způsobem pomocí cyklinů, přičemž vzniká aktivní komplex katalyzující přenos fosfátové skupiny z ATP na serinové či threoninové zbytky cílových proteinů zahrnujících transkripční regulátory. Tyto proteiny pak následně ovlivňují specifické fáze genové exprese, stimulují DNA replikaci a iniciují mitózu³⁵. Během buněčného cyklu se mění také koncentrace ODC a polyaminů³⁶. To, jak přesně spolupracuje ODC a polyaminy s CDK a příslušnými cykliny je stále třeba definovat.

Ke zvýšení koncentrace ODC a polyaminů dochází v G1 fázi, v G2 fázi a pak před mitotickým dělením. Vyšší koncentrace polyaminů může ústít v deregulaci buněčných pochodů jako je např. nadměrná proliferace, nesprávná činnost apoptotických dějů, zvýšená transkripce a exprese genů. Jelikož tyto děje velmi často vedou k invazi tumoru a metastáz, stal se metabolismus polyaminů jedním z cílů studia léčby a prevence nádorových onemocnění³².

Nedostatek polyaminů v intracelulárním prostoru může naopak vést k zástavě buněčného růstu. Například inhibice ODC specifickým inhibitorem DFMO (difluormethylornithin) způsobuje inhibici buněčného cyklu v G1 fázi³⁷. Dále může mít nedostatečné množství polyaminů vliv na např. MAPK dráhu a zvýšení JNK kinázové aktivity. Zvýšená aktivita MAPK/JNK způsobuje indukci tumor supresorového proteinu p53, což může zvýšit transkripci proteinu p21, tedy inhibici CDK a akumulaci hypofosforylované formy retinoblastoma proteinu³⁷.



Obr. č. 3: *Struktura DFMO*

3.3. Polyaminový transportní systém (PTS)

Exogenní polyaminy neprocházejí do savčí buňky volnou difuzí a to z důvodu jejich pozitivního náboje za fyziologického pH plazmy a intersticiální tekutiny. Pro transport polyaminů do intracelulárního prostoru je nutná přítomnost polyaminových transportérů a polyaminového transportního systému (PTS). Přestože bylo za posledních 8 let provedeno několik studií na permeázách, informace o nich nejsou na molekulární úrovni zcela známy³⁸. Přetrvávající nedostatek znalostí polyaminového transportu u savců má negativní dopad na komplexní pochopení fyziologických regulačních funkcí polyaminů na úrovni mnohobuněčného organismu. Ačkoliv polyaminy charakteru xenobiotik nebo radioaktivně či fluorescenčně značené polyaminy lze použít k identifikaci míst akumulace endogenních polyaminů v buňce, stále nebylo odhaleno, jak změřit aktuální molekulární změny v tkáňové expresi a aktivitě polyaminových transportérů. Otázka identity membránových polyaminových permeáz a jiných přenašečů je tedy stále předmětem intenzivního zkoumání různých týmů³⁸.

Jediným genetickým důkazem molekulární identity permeáz u savčích druhů zůstává cytogeneticky zjištěná lokalizace lokusu zodpovědného za neschopnost aktivity vychytávání diaminu a polyaminu u CHO-MG buněk. CHO-MG buňky jsou pro polyaminový transport deficitní a jedná se o mutovanou formu ovariálních buněk čínského křečka. Kromě toho existuje důkaz, že jsou savčí polyaminové transportéry kódovány jedním nebo více geny zodpovědnými za obnovu importu polyaminů, což bylo zjištěno u buněk CHO-MG při transfekci lidské genomové DNA^{39,40}.

3.3.1. Biochemie PTS

Polyaminový transportní systém je saturabilní aktivní transportní systém závislý na energii a vykazuje silnou afinitu ke svým substrátům (obvykle se jedná o rozmezí 10^{-7} - 10^{-5} M). Lze se tedy domnívat, že přítomnost aktivních přenašečů má při procesu polyaminového transportu ústřední roli³⁸.

Když první studie o PTS tvrdily, že je přenos putrescinu (částečně i spermidinu) závislý na Na^+ , analýzy byly ve všech případech provedeny pomocí izoosmotické záměny NaCl za jiné chloridové soli (LiCl, cholinchlorid) tak, aby se manipulovalo pouze s kationty⁴¹⁻⁴⁴. Pro porovnání byla provedena záměna NaCl za neelektrolyty jako je sacharóza či D-mannitol^{45,46}. Ukázalo se, že izoosmolární záměna NaCl za

neelektrolyt vedla ke zvýšení aktivity vychytávání polyaminů, a že samotný Na^+ tedy působí jako inhibitor transportní činnosti.

Transport polyaminů je mimo jiné silně závislý na membránovém potenciálu ($\Delta\Psi_{\text{pm}}$)⁴⁶⁻⁴⁸. Tato závislost se vztahuje také ke kationtovým transportérům rodiny SLC7, kam patří lysin/arginin/ornithinové permeázy (např. CAT1 = *SLC7A1*)⁴⁹ a k transportérům organických kationtů/aniontů/amfoterních iontů řadících se do rodiny SLC22 jako je např. OCT1 (*SLC22A1*) nebo přenašeč neuronálních monoaminů OCT3 (*SLC22A3*)^{50,51}.

Dalším nezbytným faktorem pro internalizaci putrescinu a spermidinu je přítomnost alespoň jednoho z exofaciálních divalentních kationtů: Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} nebo Co^{2+} (seřazeno dle účinnosti, kde Mn^{2+} je neúčinnější)^{46,52,53}. Chelatační experimenty s EDTA nebo EGTA podpořily skutečnost, že buď Mn^{2+} nebo Mg^{2+} mohou být vázány na exofaciální část nativních permeáz a jsou tedy esenciální pro polyaminový transport⁴⁶.

PTS je dále závislý na pH prostředí, do kterého jsou polyaminy vychytávány. Pro transport putrescinu je pH optimální v rozmezí hodnot 7,2-8,2, naopak při nižším pH (7,2-6,0) dochází k silné inhibici jeho příjmu. Optimum pH hodnot pro spermidin se pohybuje v oblasti 6,8-7,7⁴⁶. Tyto rozdíly ve vychytávání putrescinu a spermidinu mohou podporovat existenci odlišných typů permeáz pro jednotlivé polyaminy. Podmínka pH gradientu pro absorpci putrescinu může indikovat přítomnost zbytku titrovatelných aminokyselin (např. His). Tyto aminokyseliny s hodnotou pKa blízké fyziologickému pH mohou být zapojeny do vazby putrescinu na transportér (permeázu) a mohou mít vliv i na jeho translokaci³⁸.

Dalším důležitým parametrem pro PTS je osmolalita. Bylo prokázáno, že hypoosmotický stres několikanásobně urychluje putrescinový (v menší míře také spermidinový) transport a to jak u bakteriálních, tak u savčích buněk^{46,54-58}.

Během řady studií bylo zjištěno, že polyaminové permeázy nebo esenciální komponenty asociovány s těmito transportéry obsahují thiolové či karboxylové skupiny. O této skutečnosti svědčí úplná inhibice polyaminového příjmu *N*-ethylmaleinimidem^{7,41,59} a 1,3-dicyklohexylkarbodiimidem⁶⁰. Dalším klíčovým aspektem vazebného místa putativních permeáz pro polyaminy je schopnost vázat amiloridní deriváty, zejména 5-(*N,N*-hexamethylen)amilorid (HMA), jenž inhibuje putrescinový transport již v mikromolárních hodnotách⁴⁷.

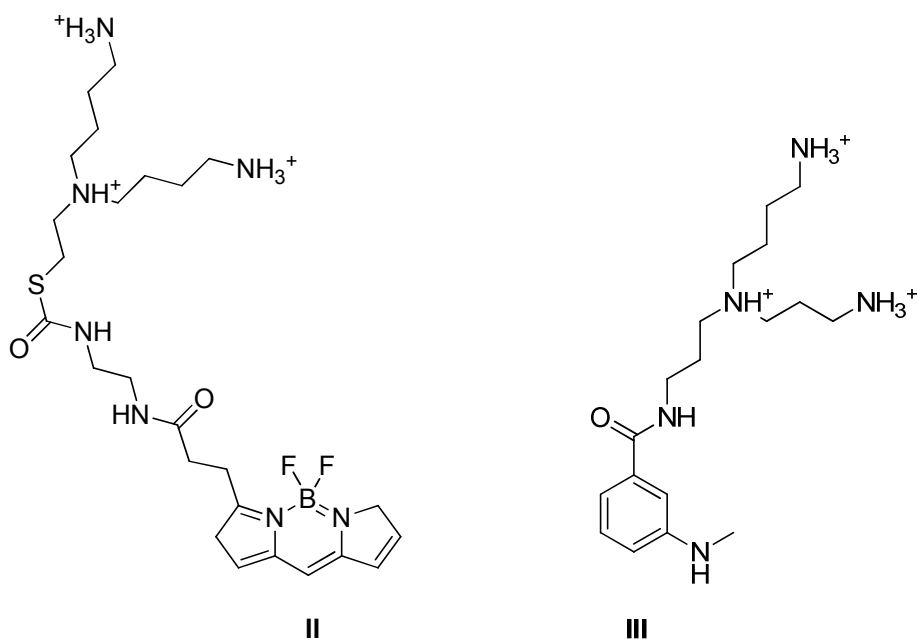
3.3.2. PTS a substrátová specifita

Během studií substrátové specifity PTS bylo zjištěno několik požadavků PTS na substrát. Substráty musí obsahovat 2 aminoskupiny s kladně nabitými centry oddělenými od sebe čtyřmi nebo více methylenovými skupinami. Pokud ve své struktuře obsahují více kladně nabitých center, afinita se zvyšuje a pak tato centra mohou být oddělena i propylenovými řetězci. Po přidání aromatického či alifatického postranního řetězce (acetylací nebo sulfonylací) sice dochází ke ztrátě jednoho náboje, ale ne ke ztrátě afinity. Dimerizace dvou potenciálních substrátů synergicky zvyšuje afinitu výsledného polyaminového dimeru. Dále bylo zjištěno, že substráty obsahující karboxylové nebo záporně nabitě skupiny nejsou PTS přijímány^{38,61-64}. Navzdory výše uvedeným informacím o substrátové specifitě PTS existují i dobře známé substráty pro PTS, které jsou strukturně odlišné od běžných alifatických polyaminů. Patří zde například paraquat a methylglyoxal bis(guanyl)hydrazon^{65,66}. Důležitý význam pak mají elektrostatické interakce mezi kladně nabitými centry divalentních/trivalentních substrátů a negativně nabitými zbytky permeáz. Zajímavé je, že různé studie SAR (včetně hexahydropyrimidinů) podpořily hypotézu o tom, že spermin/spermidin může vykazovat vysokou afinitu k permeázám, pokud je navržen jako cyklický konformer^{67,68}.

3.3.3. Vesikulární akumulace polyaminů

Histochemickými metodami byla zjištěna přítomnost polyaminů ve vezikulárních strukturách, jako jsou např. sekreční granula mastocytů či neuroendokrinních buněk⁶⁹. Kromě toho byl zkoumán PTS v synaptických váčcích, gliových buňkách a synaptosomech. Bylo zjištěno, že PTS v gliových buňkách a synaptosomech je závislý na membránovém potenciálu, zatímco PTS v synaptických váčcích je závislý na protonovém gradientu. Přenašeči v gliových buňkách byly afinitní jak ke sperminu, tak ke spermidinu. V synaptických váčcích a synaptosomech byla afinita transportérů mnohem vyšší ke sperminu. Polyaminový transport zprostředkovaný synaptosomy byl inhibován putrescinem, agmatinem, histidinem a histaminem. Transport gliovými buňkami byl také inhibován uvedenými čtyřmi látkami a navíc norepinefrinem (noradrenalinem). V případě synaptických váčků byl PTS inhibován pouze putrescinem a histaminem. Tyto výsledky naznačují, že přenašeči polyaminů v gliových buňkách, neuronech a synaptických váčcích mají odlišné vlastnosti. Dále bylo zjištěno, že se

spermin akumuluje v synaptických váčcích. Mimo jiné bylo pozorováno uvolňování sperminu z hipokampu myši, čehož bylo dosaženo depolarizací za použití vysoké koncentrace KCl⁷⁰. Aziz *et al.* (1998) a Cullis *et al.* (1999) úplně poprvé demonstrovali přítomnost polyaminů v malých na membráně vázaných intracelulárních vezikulách nazývaných také jako polyaminové sekvestrační vezikuly (PSVs)^{71,72}. K získání více informací o tom, jak jsou polyaminy internalizovány v intracelulárním prostoru, byla připravena řada fluorescenčně značených polyaminových analog. Tato analoga byla strukturně navržena tak, aby byla afinitní k PTS. K získání více informací o tom, jak jsou polyaminy internalizovány v intracelulárním prostoru, byla připravena řada fluorescenčně značených polyaminových analog. Tato analoga byla strukturně navržena tak, aby byla afinitní k PTS. Mezi velmi významné fluorescenční sondy patří N-(4,4-difluor-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl),N'-(S-[spermidin-{N4-ethyl}]-thioacetyl)ethylendiamin(Spd-C2-BODIPY) a N-{spermidin-[N4-(3-aminopropyl)]}anthranylamid (Spd-MANT). Obě sondy se akumulují v PSVs^{72,73}.



Obr. č. 4: *Struktury některých fluorescenčních polyaminů užívaných jako sondy pro studium polyaminového transportu*^{72,73}

Na téma akumulace polyaminů v PSVs existuje mnoho protichůdných názorů. Byly také navrženy tři putativní modely pro polyaminový transportní systém. Jeden z modelů popisuje, že se polyaminy mohou vázat na heparansulfát v místě glypicanu-1 a následně být receptorem zprostředkovanou endocytózou transportovány do buňky. Další model popisuje možnost přenosu polyaminů pomocí membránových transportérů využívajících elektronový transportní systém. Poslední model navrhuje, že je internalizace polyaminů vázaných na putativní receptor závislá na calveolinu-1. Navzdory tomuto pokroku, otázka polyaminové internalizace zůstává nejasná⁷⁴⁻⁷⁶.

3.3.4. Transport polyaminů membránovými transportéry (MTs)

MTs jsou proteiny, které regulují transport endogenních molekul a xenobiotik přes buněčnou membránu. U savců byly identifikovány dvě rodiny těchto proteinů (ABC a SLC). Existují určité důkazy o tom, že by se tyto MTs mohly podílet na polyaminovém transportním systému. Rodina SLC je druhou největší skupinou membránových proteinů. V důsledku jejich schopnosti přenášet různé substráty, mimo jiné také léčiva, mají důležitou roli ve vývoji léčby různých onemocnění. Tyto MTs mohou přenášet své substráty několika mechanismy a to například prostřednictvím usnadněné difuze nebo iontové výměny, což v některých případech vyžaduje aktivitu členů rodiny ABC⁷⁷.

3.3.4.1. SLC22A1/OCT1, SLC22A2/OCT2 a SLC22A3/OCT3/EMT

SLC22A1 je gen kódující polyspecifický přenašeč kationtů organických sloučenin. Tento přenašeč je známý jako OCT1 a je široce distribuován v lidských orgánech a nádorových buňkách. *SLC22A1* je exprimován především v játrech⁵¹. *SLC22A2* kóduje protein OCT2, který je tkáňově specifický, jelikož se nachází hlavně v oblasti luminální membrány distálních tubulů ledvin. Dále se OCT2 vyskytuje v neuronech lidského mozku⁷⁸. *SLC22A3* kódující protein OCT3 je exprimován v mnoha tkáních, především však v ledvinách, kosterních svalech, srdci a placentě. Protein OCT3 je také označován jako EMT (extraneuronální monoaminový transportér) a to pro jeho schopnost vycytávat noradrenalin^{51,79}.

V roce 1996 bylo publikováno, že protein OCT1 je schopen přenosu kationtů přes plazmatickou membránu. Tento transport je nezávislý na Na⁺ a navíc není citlivý na změny pH⁵⁰. Bylo také zjištěno, že OCT1 je schopen přenášet i spermin a spermidin. Jak už bylo zmíněno, transport putrescinu a spermidinu je závislý na membránovém

potenciálu. Závislost na membránovém potenciálu se vztahuje také na transport kationtů umožněný proteiny OCT1 a OCT3⁵¹. Soulet *et al.* v roce 2004 navíc navrhli, že vychytávání polyaminů může probíhat elektrogenní difuzí za účasti jednoho z transportérů OCT⁷⁴. V důsledku toho je zde možnost, že by polyaminový transport mohl být zprostředkován jedním z OCT proteinů.

3.3.4.2. SLC47A1/MATE1

SLC47A1 je gen kódující protein MATE1 (tzv. multidrug and toxin extrusion transporter-1), který má klíčovou roli v sekreci kationtů organických látek ledvinami a játry^{80,81}. MATE1 byl detekován v několika tkáních a orgánech včetně kosterních svalů, srdce a jater. Ve větším množství byl nalezen na apikální membráně proximálních a distálních tubulů ledvin⁸². Bylo zjištěno, že MATE1 umožňuje elektroneutrální export kationtů organických látek spřažený s přenosem vodíkových kationtů⁸⁰. Nedávná studie naznačila, že MATE1 neovlivňuje transport putrescinu ani složitějších polyaminů. Nicméně tyto polyaminy mohou částečně inhibovat akumulaci agmatinu v lidských embryonálních buňkách ledvin (HEK293) transfekovaných geny pro OCT1, OCT2 a MATE1⁸¹. V další studii byl navržen nový obousměrný agmatinový transportní systém zahrnující OCT1 a OCT2 jako influxní transportéry a MATE1 jako exportní přenašeč za fyziologických podmínek. Avšak při hodnotách pH = 8,00 byla akumulace agmatinu značně zvýšena v MATE1 buňkách v porovnání s falešně transfekovanými buňkami, což svědčí o tom, že MATE1 může působit také jako influxní transportér pro agmatin za podmínek alkalického pH. Afinita OCT2 pro agmatin byla desetkrát vyšší než v případě OCT1⁸¹.

3.3.4.3. SLC3A2

SLC3A2 je gen pro těžký řetězec buněčného antigenu 4F2, jenž je součástí heteromerických přenašečů aminokyselin⁸³. Bylo zjištěno, že tento gen se podílí na transportu polyaminů u savčích buněk⁸⁴. SLC3A2 transportér se stal významným terapeutickým cílem pro chemoprevenci nádorových onemocnění^{85,86}.

U CHO buněk byl SLC3A2 identifikován jako složka diaminového exportéru (DAX), který má schopnost exportovat putrescin^{87,88}. V buňkách lidského kolorektálního karcinomu (HCT116) s aktivovaným K-ras, byl SLC3A2 identifikován jako složka argininového transportéru, který může exportovat putrescin a jeho exprese je negativně regulována K-ras onkogenem⁸⁷. Dále bylo zjištěno, že SLC3A2 a

spermidin/spermin N^1 -acetyltransferáza tvoří komplex na plazmatické membráně, což by mohlo naznačovat zapojení těchto proteinů v exportu acetylovaných polyaminů⁷⁶.

3.3.4.4. SLC12A8/CCC9a

Solute carrier family 12 member 8 (SLC12A8), známý také jako cation-chloride cotransporter (CCC9) je protein, který je u člověka kódován genem *SLC12A8*. Existuje více variant pro sestřih tohoto genu a jedna z nich je označována jako *SLC12A8A/CCC9a*. Bylo zjištěno, že *SLC12A8A* je exprimován v HEK293 buňkách a plazmatická membrána těchto buněk může přijímat polyaminy a aminokyseliny jako substráty a usnadnit jejich transport. Daigle *et al.* (2009) také dospěli k závěru, že polyaminový influx byl zvýšen při indukované expresi *SLC12A8A* v HEK293 buňkách, a že tento transport nebyl citlivý na přítomnost Na^+ , K^+ nebo Cl^- ionty⁸⁹.

3.3.4.5. SLC22A16/OCT6/CT2/Flipt2

Solute carrier family 22 member 16 (SLC22A16) je označován také jako OCT6, carnithin transporter (CT2) nebo Fly-like putative transporter 2 (Flipt2)⁹⁰. V roce 2005 studie naznačily jeho primární roli při importu protinádorového léčiva doxorubicinu a později byla zjištěna jeho aktivita také při transportu polyaminů v několika buněčných liniích^{90,91}. OCT6 má omezenou distribuci v lidské tkáni, nicméně byla pozorována jeho silná exprese ve varlatech⁵¹. Bleomycin-A5 (BLM-A5) je polyaminový analog, který obsahuje spermidinový konec a byl studován jako substrát pro OCT6 transportér. Lidské testikulární buňky (NT2/D1), které exprimují SLC22A16, byly extrémně citlivé na BLM-A5. Naopak buňky lidského karcinomu tlustého střeva (HCT116) a buňky rakoviny prsu (MCF-7) byly vysoce rezistentní vůči tomuto analogu, protože exprese genu pro SLC22A16 byla buď slabá, nebo žádná. OCT6 tedy může být mediátorem ve vychytávání polyaminů a BLM-A5⁹¹.

3.3.4.6. ABCB1/MDR1

Přenašeče rodiny ABC mají přímý vliv na farmakologické vlastnosti většiny léčiv, protože ovlivňují jejich toxicitu, vedlejší účinky, exkreci, metabolismus a biodostupnost^{92,93}. Tyto přenašeče jsou závislé na hydrolýze ATP a jsou exprimovány v mnoha tkáních jako jsou játra, tenké střevo a mozek a navíc jejich exprese v různých

nádorových buňkách může vést k protinádorové rezistenci⁹⁴⁻⁹⁷. Existuje mnoho členů této skupiny, nicméně pro polyaminový transport je zajímavý člen MDR1, u kterého byl zjištěn určitý vztah k polyaminovému exportu. V přítomnosti třech nezávislých MDR1 inhibitorů byla totiž cytotoxicita spermidinového konjugátu vyšší a vyšší byla také jeho koncentrace uvnitř testovaných buněk v porovnání s buňkami kontrolními. Tento transportér je kódován genem *ABCB1*⁷⁷. Je zde tedy naděje, že tento transportér může být důležitým při procesu PTS, nicméně další studie na toto téma jsou nezbytná.

3.4. Vybrané konjugáty polyaminů s chemoterapeutiky

V porovnání se zdravými buňkami jsou v nádorových buňkách exogenní polyaminy akumulovány v mnohem vyšším měřítku⁷.

Koncentraci polyaminů v intracelulárním prostoru buňky je možno snížit užitím činidel inhibujících enzymy, které jsou zapojeny do biosyntézy polyaminů⁹⁸. Bylo připraveno několik analog s inhibičním účinkem, nicméně buňky upravené o sníženou syntézu polyaminů zvýšily příjem exogenních polyaminů prostřednictvím PTS. Vysoká aktivita PTS nádorových buněk je pravděpodobně spojena s neschopností enzymů zapojených do biosyntézy poskytovat dostatečné množství polyaminů k rychlému buněčnému dělení. Proto nádorové buňky vychytávají polyaminy z potravy nebo z mikrobiální flóry gastrointestinálního traktu. Jsou-li exogenní polyaminy eliminovány dietou spolu s dekontaminací gastrointestinálního traktu, lze docílit snížení metastáz. Toho bylo dosaženo při studiích rakoviny prostaty u člověka⁹⁹.

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, PTS lze využít pro cílený transport cytotoxických léčiv do molekulárního cíle. Ve snaze zvýšit selektivitu léčiv k nádorovým buňkám a snížit nežádoucí účinky bylo připraveno několik polyaminových analog s příslušným cytotoxickým léčivem. Většina takových látek byla navržena jako DNA-interkalující činidla využívající afinitu polyaminových kationtů k DNA¹⁰⁰ a o některých z nich bude pojednáno v této kapitole.

Jednou z prvních takto navržených látek se stal **chlorambucil-spermidinový konjugát**. Chlorambucil je alkylační činidlo široce používané pro léčbu ovariálního karcinomu a chronické lymfatické leukémie. Chlorambucil-spermidinový konjugát byl poprvé připraven v roce 1990¹⁰¹. Po dvou letech byly provedeny *in vitro* studie na schopnost interkalace, vychytávání a cytotoxicitu a *in vivo* studie na protinádorové

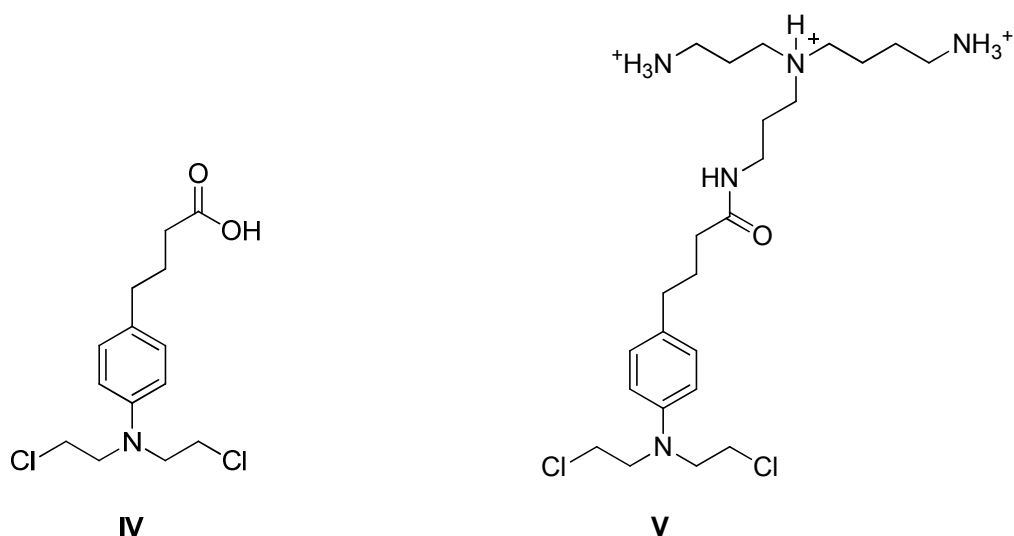
účinky. *In vitro* studie byly provedeny na buněčné linii plazmocytomu (ADJ/PC6). Ukázalo se, že tento konjugát je 10 000krát účinnější v tvorbě DNA-crosslinků než samotný chlorambucil. To bylo pozorováno na izolované DNA zbavené histonů. Inhibice vychytávání radioznačeného nescificky vázaného [¹⁴C]-spermidinu do ADJ/PC6 buněk vykazovala nízké hodnoty K_i (0,8 μ M), což indikovalo vysokou afinitu pro polyaminový vychytávací systém. *In vitro* cytotoxicita N^4 -spermidin-chlorambucilu a chlorambucilu byla hodnocena na buňkách ADJ/PC6 stanovením jejich schopnosti inhibovat inkorporaci [³H]thymidinu do DNA. Výsledné hodnoty cytotoxicity potvrdily, že je konjugát 35krát efektivnější v porovnání s chlorambucilem a navíc po přidavku DFMO se cytotoxicita projevila ještě 225krát výrazněji při vystavení buněk po dobu 1 hodiny. Dále byly buňky vystaveny látkám po dobu 72 hodin (viz tabulka č.1)¹⁰².

Látka	IC ₅₀ μ M v čase			
	Kontrola		DFMO	
	1 h	72 h	1 h	72 h
Chlorambucil	8,9 \pm 1,19	0,22 \pm 0,02	22,5	0,31 \pm 0,03
Chlorambucil-spermidin	0,25 \pm 0,04	0,03 \pm 0,003	0,10 \pm 0,016	0,013

Tabulka č. 1: Hodnoty IC₅₀ pro chlorambucil a jeho spermidinový konjugát v čase 1h a 78h

Testování *in vivo* bylo provedeno u myších samic (BALB/c), do kterých byly buňky ADJ/PC6 subkutánně implantovány. *In vivo* protinádorová aktivita se v případě konjugátu zvýšila pouze čtyřnásobně. Hodnota ED₉₀ (koncentrace látky redukující velikost nádoru o 90%) pro konjugát byla 2,83 μ mol/kg a pro chlorambucil samotný 10,95 μ mol/kg. Dále hodnota LD₅₀ byla výrazně nižší u konjugátu než u chlorambucilu a to pravděpodobně z důvodu akutní neurotoxicity nervového systému a tedy rozdíl v terapeutickém indexu nebyl znatelný. Menší zvýšení v protinádorové aktivitě *in vivo* neodráží 35násobné zvýšení toxicity pozorované *in vitro* ani 10 000násobné zvýšení reaktivity s DNA¹⁰². Progresivní ztráta aktivity může mít řadu vysvětlení. Konjugát mohl být hydrolyzován ještě před dosažením jádra nebo mohl reagovat s jinými komponentami než je DNA, dále vazba jaderné DNA mohla být slabší než vazba izolované DNA, případně mohlo být konjugátu jiným způsobem znemožněno dosáhnout jaderné DNA. Cullis *et al.* (1995) zjistili, že ve vodném tlumivém roztoku

chlorambucil a spermidin-chlorambucil hydrolyzují přibližně za 20 minut¹⁰³. Výsledky z průtokové cytometrie na fluorescenčním N^4 -spermidin-MANT konjugátu ukázaly nízkou rychlost vychytávání (24 hodin). Proto pokud vychytávání N^4 -spermidin-chlorambucilu trvá 24 hodin, byl by hydrolyzován dříve než by docílil jádra. Rychlost vychytávání N^4 -spermin-NO derivátu pozorovaná pomocí elektronové paramagnetické rezonance byla rychlá (cca 30 minut)¹⁰⁴. Z toho důvodu bylo navrženo, že sperminové konjugáty mohou s větší šancí interagovat s DNA před hydrolyzou. Dále byly v roce 1998 studovány další modifikace polyamin-chlorambucilového konjugátu za účelem snížení systémové neurotoxicity¹⁰⁵.

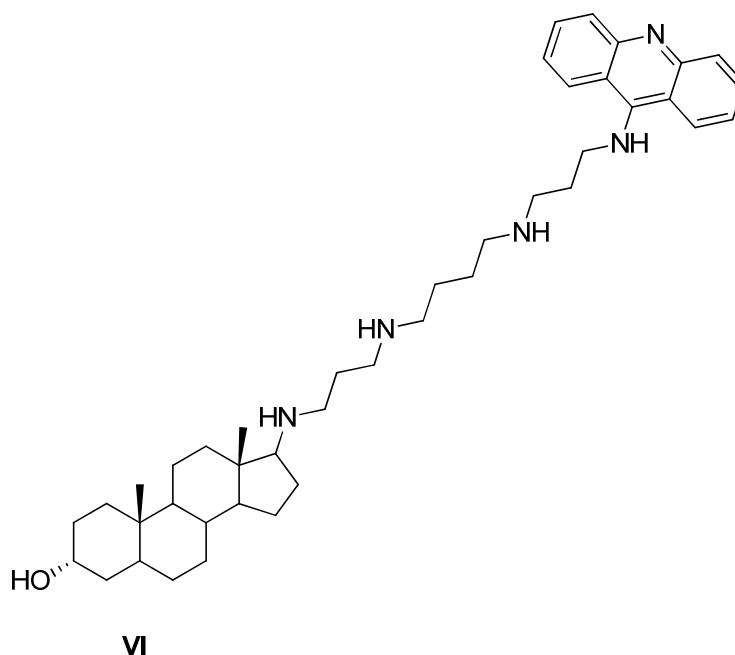


Obr. č. 5: Struktury chlorambucilu a jeho spermidinového konjugátu

Deriváty akridinu jsou známy jako DNA interkalátory¹⁰⁶. U několika derivátů byla prokázána schopnost inhibovat aktivitu topoizomeráz^{107,108}. Bylo publikováno několik informací o polyaminovém řetězci kovalentně vázaném na akridinu. Ukázalo se, že přítomnost polyaminu neovlivňuje schopnost interkalace akridinu, že dochází ke zvýšení afinity k DNA, a také že schopnost akridinu inhibovat topoizomerázu zůstává zachována^{109,110}.

Dále bylo dokázáno, že je spermin ze všech přirozených polyaminů vychytáván v buněčných nádorových liniích prostaty s vyšší afinitou, že blokuje proliferaci nádorových prostatických buněk *in vitro* a navíc zabraňuje vývoji nádoru prostaty *in vivo*^{111,112}. Vlastnosti akridinu a sperminu motivovaly Maurice *et al.* (2009)¹¹³ k přípravě a studiu biologické aktivity šesti spermin-akridinových konjugátů. Navíc jedna z připravených látek byla složena ze tří částí a to akridinu a jeho derivátů, sperminu a

navíc androsteronu. Očekávalo se, že by planární akridinová část interagovala s DNA páry bází, přičemž polyamin by se vázal jak na záporně nabitě fosfátové skupiny DNA, tak na DNA báze a pokud by se androsteron vázal na androgenní receptory, mohla by se celá molekula dostat do požadovaného cíle. Pro studium cytotoxicity byly zvoleny dva typy buněčných linií a to androgen-senzitivní (LNCaP) a androgen-insenzitivní (PC3) linie. Všechny deriváty kromě jednoho vykazovaly v obou případech buněčných linií velmi podobné hodnoty cytotoxicity a ukázalo se, že jsou účinnými inhibitory buněčného dělení buněk karcinomu prostaty *in vitro*. Konjugát obsahující ve své struktuře androsteron byl účinný v případě LNCaP linie ($IC_{50} = 0,6 \mu M$), naopak u PC3 byla účinnost snížena o polovinu¹¹³.

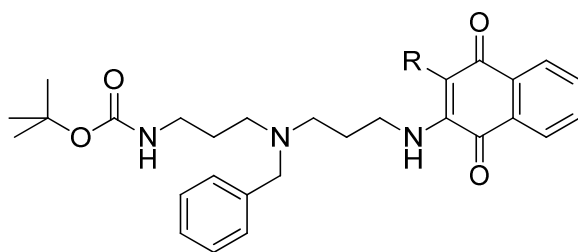


Obr. č. 6: *Struktura akridinového konjugátu se sperminem a androsteronem*

1,4-Naftochinony se vyskytují v přírodě a existuje mnoho klinicky významných protinádorových látek obsahujících ve své struktuře chinonovou část. Jednou z takových látek je lapachol (2-hydroxy-3-prenyl-1,4-naftochinon), který je účinný proti karcinomu Walker-256 a Yoshida sarkomu¹¹⁴.

U syntetických derivátů lapacholu jako je 2 β -O-glykosid-tetraacetát¹¹⁵ a furano-1,4-naftochinonů¹¹⁶ byla prokázána protinádorová aktivita na buněčných liniích leukémie a solidního tumoru. Bylo zjištěno, že deriváty chinonu mohou působit jako inhibitory topoizomeráz skrze interkalaci do DNA. Jejich toxicita může být vysvětlena pomocí ROS (reactive oxygen species)¹¹⁷. V roce 2008 byla publikována příprava řady

naftochinonových derivátů vázaných s polyaminem, konkrétně s N^1 -boc- N^5 -Bn-spermidinem¹¹⁸. Následně byly tyto deriváty odchráněny k vyhodnocení účinku protektivní boc skupiny na aktivitu látek. K vyhodnocení cytotoxické aktivity byla provedena MTT esej. Všechny připravené látky byly aktivní proti lidským nádorovým buněčným liniím promyelocytární leukémie (HL-60), plicního nádoru (GLC4), Burkittova lymfomu (Daudi) a myším buněčným liniím nádoru prsu (Ehrlich karcinom). Nicméně pouze odchráněné deriváty vykazovaly aktivitu u lidské buněčné linie melanomu (MV-3). Také byla hodnocena schopnost látek indukovat apoptózu v linii HL-60 a u jednoho z derivátů produkce ROS. Bylo zjištěno, že spermidin-1,4-naftochinonové konjugáty vykazovaly zvýšení aktivity ve srovnání s přírodními produkty a indukovaly apoptózu u nádorových buněčných linií pravděpodobně mechanismem zahrnujícím produkci ROS¹¹⁸.



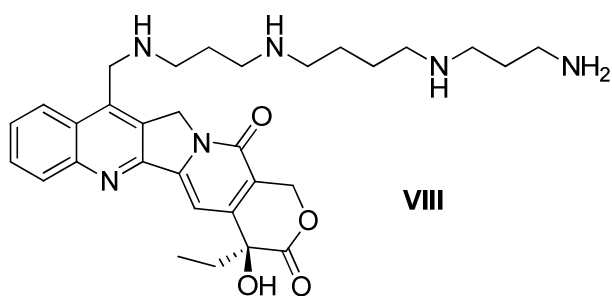
VII

R = H (VIIa); $\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$ (VIIb);
 $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ (VIIc)

Obr. č. 7: Struktura konjugátu naftochinonu s příslušným polyaminovým řetězcem

Camptothecin a jeho analoga jsou silnými inhibitory topoizomerázy I (topI)¹¹⁹. Dvě analoga (topotecan a irinotecan) jsou významnými klinicky užívanými protinádorovými látkami. Mnoho dalších analog je v pokročilém stádiu klinických studií¹²⁰. Camptotheciny se vážou na komplex topI-DNA (topI-DNA cleavage complex; topI-DNAcc) a tvoří tak ternární komplex¹²¹. Protože se camptotheciny vážou lépe k topI-DNAcc než k samotné DNA, přidáním polyaminu afinitního k DNA by mohlo dojít ke zvýšení stability ternárního komplexu či k modifikaci vzoru štěpení. Dallavale *et al.* (2006)¹²² demonstrovali přípravu a výsledky biologického testování několika derivátů camptothecinu s polyaminem vázaným v pozici 7 camptothecinu skrze amino, imino či oxyiminomethylovou skupinu. Všechny tyto látky byly aktivní proti buněčné linii lidského plicního karcinomu (H460). Iminomethylderiváty, u kterých byly

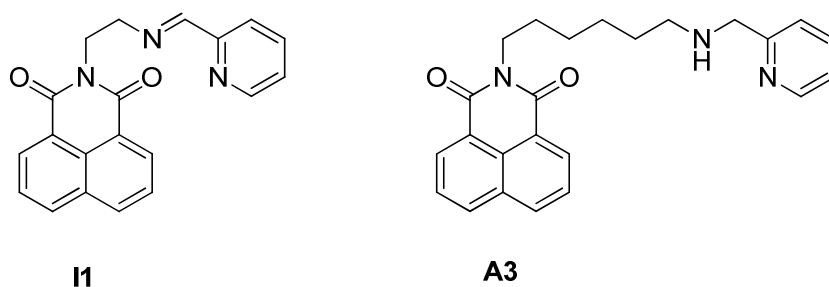
aminoskupiny polyaminového řetězce chráněny skupinami boc, byly vysoce účinné ($IC_{50} \sim 10^{-8}M$). Štěpení DNA *in vitro* a přetrvávání ternárního komplexu byly pozorovány u konjugátů obsahujících polyaminový zbytek s volnými aminoskupinami. Nedostatek konkrétní korelace mezi stabilizací komplexu a inhibicí růstu odráží více faktorů - např. farmakokinetické chování související s lipofilitou konjugátu nebo způsob propojení polyaminového řetězce¹²².



Obr. č. 8: Konjugát camptothecinu obsahující polyaminový řetězec s volnými aminoskupinami

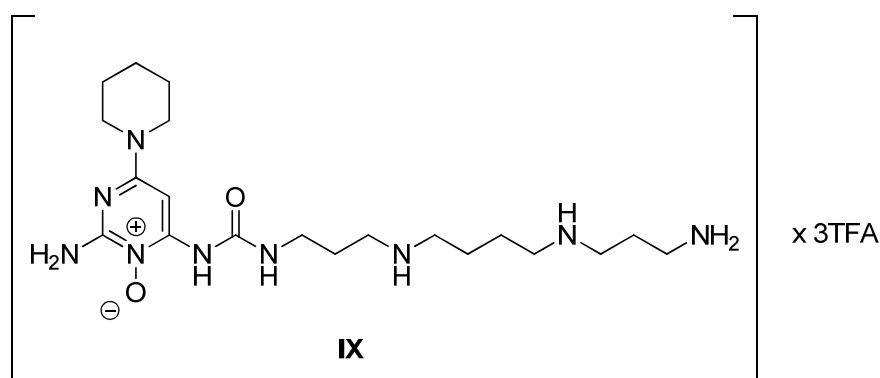
Naftalimid-polyaminové konjugáty jsou novou sérií konjugátů, které byly připraveny a následně biologicky testovány pro jejich *in vitro* antiproliferativní aktivitu na lidských buněčných liniích leukémie (Jurkat), cervikálního adenokarcinomu (HeLa), prsního adenokarcinomu (MCF-7) a plicního adenokarcinomu (A549). Z šesti derivátů nový I1 a A3 deriváty vykazovaly nejvyšší antiproliferativní aktivitu s hodnotami IC_{50} v rozmezí 5,67-11,02 $\mu\text{mol/l}$. Analýza buněčného cyklu buněk leukémie (Jurkat) vystavených derivátu I1 v koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 24 hodin vykazovala mírné zvýšení v S a G2/M frakci způsobené akumulací buněk. Po 48 hodinách inkubace došlo také ke zvýšení v sub-G0/G1. Jurkat buňky vystaveny derivátu A3 v koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 24 hodin vykazovaly zvýšení v G0/G1 frakci a po 48 hodinách zvýšení ve frakci G2/M následovanou zvýšením v sub-G0/G1 po 72 hodinách inkubace. Kromě toho byla sloučenina A3 studována pro přesun interkalačního činidla ethidium bromidu z DNA telecího brzlíku použitím fluorescenční spektroskopie. Zdálnivá vazebná konstanta byla stanovena na $3,1 \times 10^6/M$, která indikuje neinterkalační způsob vazby DNA. Na druhou stranu nebyl zjištěn inhibiční efekt studovaných sloučenin na aktivitu

topI a topII. Lokalizace těchto sloučenin v buňkách díky jejich přirozené fluorescenci byla zkoumána fluorescenční mikroskopií. Výsledky naznačily, že konjugáty naftalimidu s polyaminem rapidně pronikají do nádorových buněk. Je nutné provést další studie k prozkoumání přesného mechanismu účinku a zjistit vztah mezi strukturou, charakterem a pozicí substituentů naftalimid-polyaminových konjugátů a jejich biologickou aktivitu¹²³.



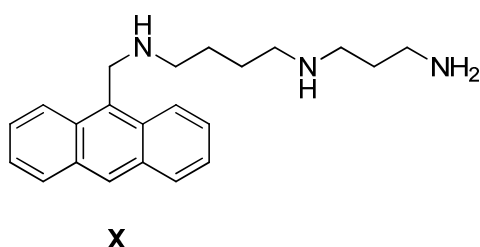
Obr. č. 9: *Struktury naftalimid-polyaminových konjugátů*

Aktivace minoxidilu s N,N'-karbonyldiimidazolem, přírodními polyaminy, dostupnými komerčními alifatickými a aromatickými aminy poskytla sérii nových konjugátů¹²⁴, které byly hodnoceny pro svou schopnost indukovat diferenciaci HL-60 buněk akutní myeloidní leukémie použitím modifikovaného NBTZ redukčního testu. Přestože MNX, 4-4'-methylenedianilin (MDA) ani 2,7-diaminofluoren (DAF) (ať už samotné nebo v kombinaci) neměly žádný účinek, **MNX-sperminový konjugát** a konjugáty MNX s MDA a DAF vykazovaly efekt diferenciacní indukce v koncentraci 10 μ M aniž by byly toxické pro proliferativní mononukleární buňky periferní krve.



Obr. č. 10: *MNX-sperminový konjugát*

Další skupinu biologicky aktivních konjugátů tvoří **anthracenové deriváty**. Bylo zjištěno, že triamin (homospermidin) je lépe rozpoznáván polyaminovým transportním systémem, než je tomu u přírodních polyaminů. Ze série připravených anthracenových konjugátů je velmi významný derivát Ant-4,4 (anthracenylmethyl homospermidin), jenž vykazuje vynikající PTS selektivitu a cytotoxicitu vůči několika nádorovým buněčným liniím^{4,125,126}. Byly pozorovány synergické antiproliferativní účinky Ant-4,4 v kombinaci s DFMO jak na nádorových liniích myších buněk L1210, tak lidských HL-60^{4,127}. Novější studie byla zaměřena na zjištění cytotoxicity Ant-4,4 a posouzení dlouhodobých účinků této látky na buňkách HL-60 určením schopnosti obnovy těchto nádorových buněk po samotné léčbě¹²⁸. Derivát Ant-4,4 byl v buňkách HL-60 pozorován jako efektivní inhibitor růstu. Současně se snižováním počtu živých buněk byl snížen také obsah proteinů a polyaminů uvnitř buněk. Nicméně navzdory vysoké efektivitě tohoto derivátu byla léčba postupem času reverzibilní, tedy HL-60 byly schopny obnovy. Obnova se projevila zvýšením počtu buněk, obsahu proteinů i polyaminů a rovněž se snížily účinky na buněčný cyklus a apoptózu. Tyto údaje naznačují, že i přes efektivní způsob transportu anthracenu do buněk, tento polyaminový konjugát nevykazuje na buňkách HL-60 dlouhodobý účinek¹²⁸.



Obr. č. 11: *Struktura anthracen-homospermidinového konjugátu*

F14512

Dnes nejvýznamnější cytotoxickou látkou s polyaminovým řetězcem využívající PTS pro zvýšenou selektivitu je látka F14512. Jedná se o konjugát epipodophyllotoxinu (etoposidu) a sperminu schopný specificky cílit nádorové buňky s aktivním PTS a vázat se s vyšší afinitou k DNA než samotný etoposid¹⁰⁰. Zvýšená afinita k DNA je faktorem zesilujícím inhibiční účinek chemoterapeutika vůči topoizomeráze II. Léčivo ve formě konjugátu se vyznačuje lepší biodostupností i vzhledem k jeho zvýšené rozpustnosti ve vodě. Bylo provedeno několik *in vitro* a *in vivo* studií, které prokázaly vyšší

protinádorové účinky F14512 v porovnání s etoposidem^{100,129-135}. Výsledky preklinických studií vedly k podpoře postupu F14512 do klinického testování. Fáze I klinického testování byla zahájena u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Slibná antileukemická aktivita byla pozorována v různých dávkovacích úrovních¹³⁶ a F14512 je v současné době ve fázi I/II klinického testování v kombinaci s cytarabinem.

Barret *et al.* (2008) demonstrovali, že F14512 je 73krát více cytotoxický u CHO buněk v porovnání s CHO-MG (s buňkami s redukovanou PTS aktivitou). Dále studovali antiproliferativní účinky F14512 na 29 lidských nádorových buněčných liniích jako jsou buněčné linie leukémie, nádoru prsu, nádoru plic, melanomů a sarkomů. Medián hodnot EC₅₀ v případě F14512 byl stanoven na 0,18μM, v případě etoposidu na 1,4μM. Současně byl testován efekt exogenních polyaminů na antiproliferativní účinek F14512 nebo etoposidu u myších leukémických buněk (L1210), jenž byl stanoven pomocí MTT eseje po 48 hodinové inkubaci s léčivem samotným nebo v přítomnosti putrescinu, spermidinu a sperminu. Bylo zjištěno, že citlivost L1210 byla vyšší na samotný konjugát F14512 bez přítomnosti exogenních polyaminů. V případě etoposidu nebyl takový rozdíl v citlivosti vyzorován. Dále se ukázalo, že konjugace se sperminem vedla k výraznému zlepšení interakce mezi cytotoxickým léčivem a DNA a tím k zesílení inhibice topoizomerázy II. *In vivo* protinádorová aktivita byla také testována a to na xenograftu lidského prsního nádoru MX-1 s částečnou a kompletní nádorovou regresí¹⁰⁰.

Další preklinická studie byla zaměřena na definování F14512 protinádorové aktivity a na zjištění, zda fluoroforem značené polyaminové próby mohou být používány k identifikaci nádorů s aktivním PTS¹³³. Osmnáct nádorových modelů bylo použito k posouzení protinádorové aktivity F14512 *in vivo*. Vychytávání fluorescenčních prób bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie v buňkách odebraných z xenograftů. Akumulace fluorescenční próby u C57BL/6 myši s B16 melanomy *in vivo* byla hodnocena pomocí infračerveného fluorescenčního zobrazování. Tato preklinická studie potvrdila protinádorové účinky F14512. U 67% testovaných nádorových modelů byla vyvolána signifikantní odpověď na léčivo. Z toho u 33% modelů (MX-1, LXFL569, SXF 1301 a P388) byla pozorována vysoká úroveň aktivity (viz tabulka č. 2). Míra fluorescence emitované fluorescenčními próbami v buňkách odebraných z nádorů citlivých na F14512 byla vyšší než v buňkách odebraných z nádorů se sníženou citlivostí k tomuto chemoterapeutiku. Na základě tohoto zjištění bylo navrženo, že tyto

próby by mohly být užívány k identifikaci nádorů s aktivním PTS a tím využity pro selekci pacientů, kteří by mohli být léčeni látkou F14512¹³³.

Model	Histologický typ	Harmonogram (dny po implantaci nádoru)	Optimální dávka [mg/kg/inj]	Protinádorová aktivita				Maximální medián změny tělesné váhy [%]
				Optimální T/C [%]	KR [%]	ČR [%]	Aktivita	
MX-1	Karcinom prsu	7,9,11,14,16,18	1,25	0	70	80	Vysoká	0,9
SXF 1301	Sarkom	19,21,24,26,28,31	1,9	9	12,5	75	Vysoká	-9,3
LXFL529	Karcinom plic	11,13,15,18,20,22,32,34,36	1,9	2,4	30	50	Vysoká	-1,6
P388	Leukémie	1,2,3,4	2,5	200	-	-	Vysoká	-2,9
HCT-116	Karcinom tl. střeva	7,8,9,10,14,15,16,17	1,25	39	0	0	Nizká	-0,9
PAC120	Adenokarcinom prostaty	52,54,56,59,61,63,73,75,77	0,32	23	0	10	Nizká	-10,5
NAMALWA	Burkittův lymfom	3,5,7,10,12,14	0,32	147	-	-	Nizká	-20,9
SXF 463	Sarkom	28,30,32,35,37,39	1,25	34	0	0	Nizká	-8,9
SXF 117	Sarkom	13,15,17,20,22,24	1,25	38	0	0	Nizká	-9,1
LoVo	Adenokarcinom tl. střeva	14,16,18,21,23,25	1,9	41	0	0	Nizká	-14,0
B16	Melanom	3,5,7,10	1,25	26	0	0	Nizká	0,2
WM266-4	Melanom	11,13,15,18,20,22	1,25	42	0	0	Nizká	0,0
DLD-1	Adenokarcinom tl. střeva	7,8,9,10,14,15,16,17	1,25	49	0	0	0	-0,9
A549	Karcinom plic	18,20,22,25,27,29	1,25	54	0	0	0	1,1
CMEL-5	Melanom	26,28,30,33,35,37	1,9	63	0	0	0	0,5
MCF-7	Adenokarcinom prsu	6,8,10,13,15,17	1,25	70	0	0	0	-0,7
DU145	Karcinom prostaty	27,29,31,34,36,38	1,25	46	0	0	0	0,0
LS174T	Adenokarcinom tl. střeva	14,16,18,21,23,25	1,25	55	0	0	0	-2,5

Tabulka č. 2: Výsledky preklinických studií látky F14512 na 18 modelech in vivo

Optimální dávka je dávka indukující maximální protinádorovou účinnost (maximální inhibici růstu nebo prodloužení délky života) bez vážných toxických vedlejších účinků.

TC = (medián objemu nádoru léčené skupiny / medián objemu nádoru kontrolní skupiny) x 100 pro modely solidních nádorů, pro které je kritériem aktivity inhibice růstu nádoru

TC = (medián přežití léčené skupiny / medián přežití kontrolní skupiny) x 100 pro intravenózně implantované modely nádorů (to jsou modely P388 a NAMALWA), pro které je kritériem aktivity nárůst přežití

KR = Kompletní regrese nádoru (v průběhu studie může nádor vykazovat nejprve částečnou regresi a později kompletní regresi, tedy v takovém případě je částečná i kompletní regrese zaznamenána pro jeden a ten samý model)

ČR = Částečná regrese nádoru

Aktivita = hodnocení pro úroveň protinádorové aktivity je definováno dle kritérií NCI^{137,138}.

*Vysoká úroveň aktivity (Vysoká): pro modely solidních nádorů: $T/C \leq 10\%$
pro intravenózně implantované tumory: $T/C \geq 175\%$*

*Nízká úroveň aktivity (Nízká): pro modely solidních nádorů: $10\% < T/C \leq 42\%$
pro intravenózně implantované
tumory: $120\% < T/C \leq 175\%$*

*Neaktivní (0): pro modely solidních nádorů: $T/C > 42\%$
pro intravenózně implantované tumory: $T/C < 120\%$*

Maximální medián změny tělesné váhy je maximální ztráta hmotnosti těla vyjádřené jako procento původní hmotnosti. Dle kritérií NCI je dávka považována za toxickou při úbytku tělesné hmotnosti $> 20\%$ počáteční tělesné hmotnosti.

Dále během biologického testování na buňkách nemalobuněčného karcinomu plic (A549) bylo zjištěno, že F14512 je třicetinasobně více toxický než etoposid a vyvolává různé mechanismy buněčné smrti¹³⁰. U buněk A549 bylo navíc pozorováno, že F14512 je narozdíl od etoposidu účinným induktorem senescence. V buněčné linii leukémie (P388) vykazoval etoposid i F14512 podobnou cytotoxicitu vyznačující se senescentním fenotypem a následnou apoptózou¹³⁹.

Vyšší cytotoxický efekt F14512 v porovnání s etoposidem byl pozorován na buněčné linii dlaždicového karcinomu hlavy a krku a navíc byl tento konjugát schopen působit synergicky s ionizujícím zářením a cisplatinou¹³⁵.

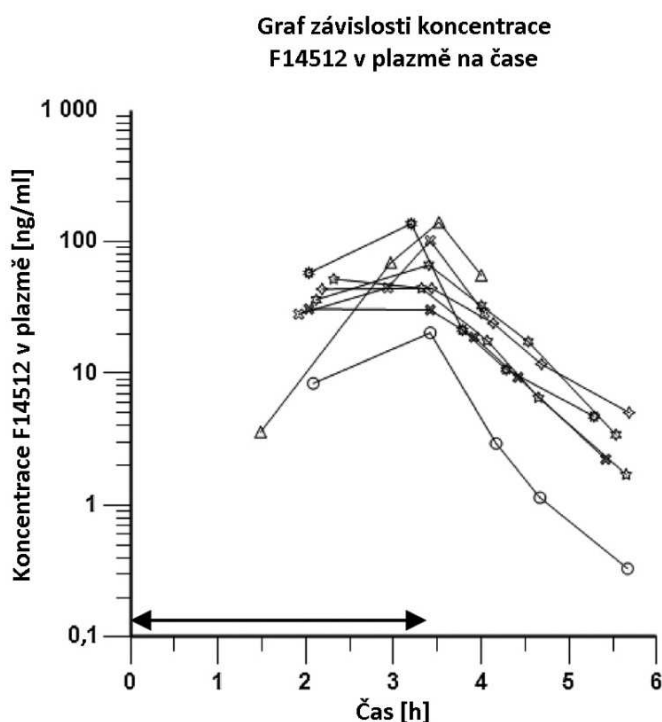
Vzhledem k mnoha podobnostem lymfomů u člověka a psů vznikla snaha zjistit toleranci, účinnost, farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti F14512 ve vztahu k tomuto onemocnění a navíc zjistit potenciální biomarkery, které by mohly být využívány při testování na lidech¹⁴⁰. Ukázalo se, že psi mohou být nejrelevantnějším zvířecím modelem pro studium lymfomů, protože přirozeně se vyskytující lymfomy u psů jsou vzhledem k jejich růstu v neporušeném imunitním systému, interindividuální a intratumorové heterogenitě, vývoji recidivujících chorob a metastáz mnohem podobnější lidským než je to v případě myších xenograftů¹⁴¹. Etoposid byl studován u psů pro farmakokinetiku a toxikologické účely^{142,143}, nicméně v případě psů je k dispozici málo dat o jeho protinádorové aktivitě^{144,145}. Retrospektivní studie u 13 psů s relapsujícím lymfomem léčených etoposidem ukázala nízký terapeutický účinek etoposidu¹⁴⁶. Po podání etoposidu byla pozorována hematologická toxicita a také akutní

svědění kůže^{143,146}. Protože účinky etoposidu na lymfom u psů nebyly příliš pozitivní, vzrostl zájem o testování F14512. Dvacet tři psů s přirozeně vyskytujícími se lymfomy (ve stádiu III-IV) byli zařazeni do fáze I testování, které probíhalo ve třech cyklech, kdy byl F14512 podáván intravenózně s postupně se zvyšujícími dávkami¹⁴⁰. Odběry krevních vzorků a biopsie nádorových tkání byly provedeny k získání materiálu pro studie biomarkeru a PK/PD. Pět dávkovacích úrovní bylo použito k určení doporučené dávky. F14512 byl testovanými subjekty dobře tolerován s očekávanou hematologickou toxicitou v závislosti na dávce. F14512 indukoval časné snížení nádorových buněk lymfatických uzlin s vysokou mírou odezvy 91% (21 z 23 testovaných subjektů) s 10 kompletními odpověďmi a 11 částečnými. Dále u 1 subjektu nebyla vyzorována změna ve velikosti nádoru a u 1 došlo k progresivnímu průběhu. Inhibice topoizomerázy II vede k tvorbě štěpitelných komplexů a DSB (double-strand break) DNA, které jsou charakterizovány fosforylací H2AX na Ser-139. Fosforylovaný H2AX (P-H2AX) je tedy reportérem poškozené DNA. Měřením fosforylace tohoto histonu na Ser-139 na buněčné linii Namalwa (Burkittův lymfom) byl sledován vliv F14512 na poškození DNA. Zvýšení P-H2AX proběhlo již po 4 hodinách inkubace F14512 a procento obarvených buněk se stabilizovalo po 16 hodinách. Fosforylace histonu H2AX byla studována také jako potenciální *in vivo* PD biomarker konjugátu F14512 u psů. Indukce P-H2AX byla pozorována průtokovou cytometrií již po dvou hodinách po ukončení infúze F14512 (0,05 mg/kg) a její inkrementace probíhala ve čtyřech hodinách¹⁴⁰.

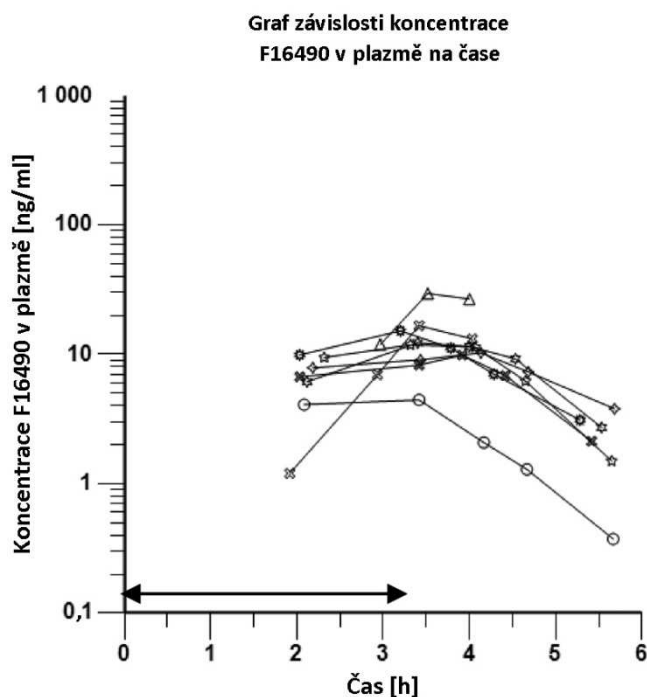
Pro PK studii byli psi zařazeni do 5 skupin s dávkami 0,050; 0,060; 0,070; 0,075; 0,085 mg/kg. Hodnoty AUC pro F14512 a jeho metabolit F16490 se zvýšily s množstvím dávky. Tabulka č. 3 a grafy č. 3 a č. 4 znázorňují vztah koncentrace F14512 a F16490 v plazmě na čase v prvním dnu při podání doporučené dávky 0,075 mg/kg. Koncentrace F14512 v plazmě se u většiny psů pohybovaly v rozmezí odhadovaných hodnot IC₅₀ v Namalwa modelu (46 nmol/l = 29 ng/ml) v přibližně 2 až 3 hodinách. Pouze v jediném případě s nízkou koncentrací léčiva v plazmě nedošlo k odpovědi na léčbu. Jinde bylo AUC aktivního metabolitu F16490 a látky F14512 přiměřené a v průměru F16490 AUC zastupovalo 23% F14512 AUC¹⁴⁰.

Dávkování (mg/kg)					
	0,05	0,06	0,07	0,075	0,085
N	5	3	3	8	4
F14512 AUC (h*ng/ml)					
Min	38,7	52,7	62,5	36,2	73,7
Median	45,2	83,4	115	142	126
Max	73,8	102	261	224	152
F16490 AUC (h*ng/ml)					
Min	8,89	27	21,4	13,9	27,7
Median	12,6	28,3	25,2	36,2	35,2
Max	20,5	29,9	38,5	42,7	40,6

Tabulka. č. 3: Koncentrace léčiva v plazmě (AUC) [h*ng/ml] v závislosti na dávkování [mg/kg] u jednotlivých skupin testovaných subjektů



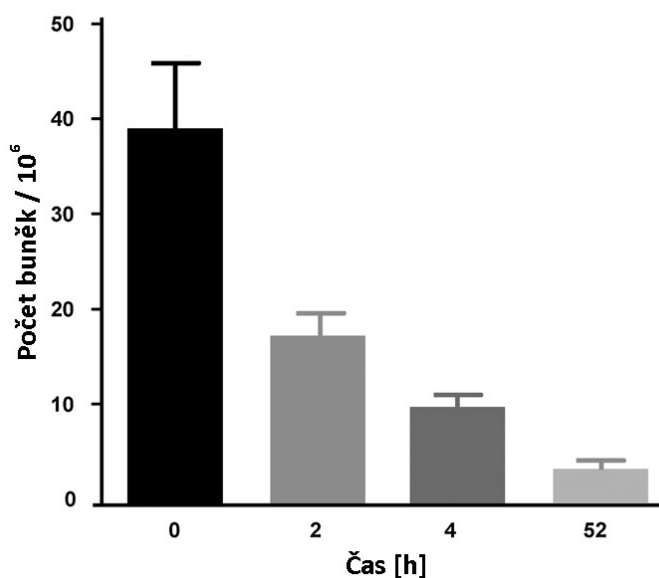
Graf č. 1: Koncentrace F14512 v plazmě v závislosti na čase u všech testovaných subjektů (psů) vystavených doporučenému dávkování 0,075 mg/kg po první infúzi (cyklus 1, den 1). Infúze F14512 začala v čase $t=0$ a trvala 3,25 - 3,63 hodin (\leftrightarrow)



Graf č. 2: *Koncentrace F16490 v plazmě v závislosti na čase u všech testovaných subjektů (psů) vystavených doporučenému dávkování 0,075 mg/kg po první infúzi (cyklus 1, den 1)*

Pro studii farmakodynamiky byly lymfatické nádorové buňky a krevní buňky monitorovány v počáteční fázi klinického testování ke zjištění, zda může být léčba F14512 spojována s jakýmkoliv biologickým efektem. Po injekčním podání F14512 byla v následujících hodinách provedena série odběrů vzorků z nádoru lymfatických uzlin. Na základě těchto odběrů se hledaly PD markery F14512. Díky zjištění celkového počtu buněk v sérii odběrů byl vyhodnocen a normalizován objem odběru. Bylo pozorováno rapidní snížení počtu buněk (Graf č.3) již po dvou hodinách od podání F14512. K dramatickému snížení počtu buněk došlo na konci prvního cyklu léčby F14512. Tak silný účinek na nádorové buňky znemožnil analýzu indukce P-H2AX u všech pacientů. F14512 způsobil velký úbytek živých buněk a došlo ke vzniku velkého množství nekrotických buněk a jejich částí. To zapříčinilo nespolehlivost vyhodnocování P-H2AX průtokovou cytometrií. Tento znatelný pokles celkového počtu buněk lymfatických uzlin byl pozorován při každém dávkování a byl jasným PD markerem účinnosti F14512¹⁴⁰.

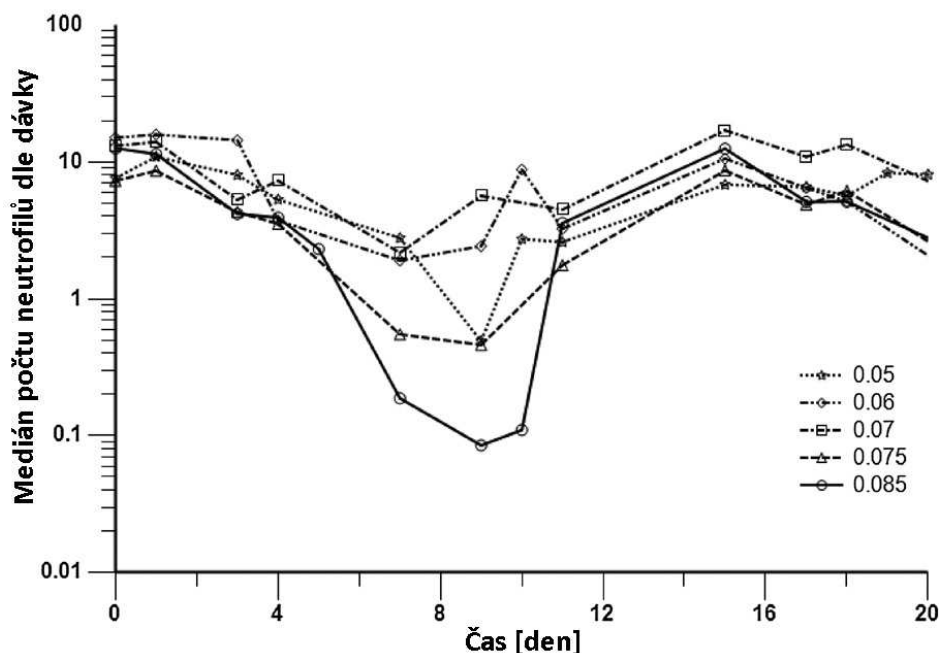
Graf poklesu počtu buněk za čas



Graf č. 3: Graf znázorňuje celkový počet nádorových buněk lymfatických uzlin v závislosti na čase v 1 ml vzorku všech psů ve všech dávkovacích úrovních. Vzorky byly odebírány po dobu prvního cyklu aplikace léčiva F14512. Infúze začala v čase $t=0$ a trvala 3 hodiny denně (1. den 0-3 h, 2. den 24-27 h, 3. den 48-51 h).

Počet krevních buněk může být jak markerem účinnosti, tak toxicity. Dle očekávání došlo ke snížení počtu bílých krvinek (neutrofilů, lymfocytů a monocytů) po každém cyklu terapie. Vztah mezi dávkou a účinkem byl pozorován na dávce F14512 a počtu neutrofilů (Graf č. 4). Tento pokles byl reverzibilní a základní úrovně se vrátily do dalšího cyklu. Vyhodnocení poklesu bílých krvinek včetně doby poklesu korelovalo s dávkou F14512 a umožnilo určení hodnot toxicity limitující dávku (DLT, dose-limiting toxicity)¹⁴⁰.

**Graf mediánu počtu neutrofilů dle dávky
v závislosti na čase**



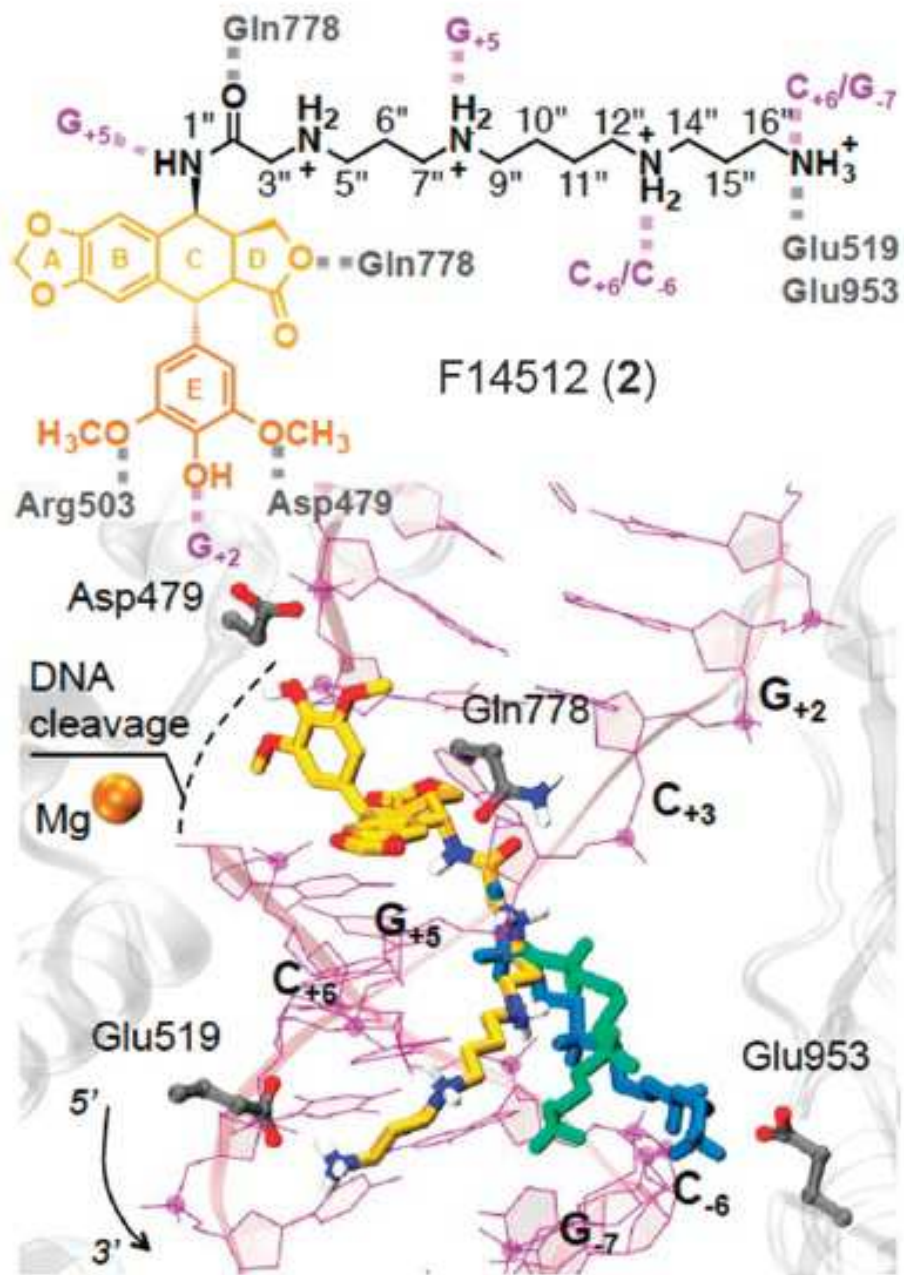
Graf č. 4: Graf znázorňuje vztah dávka-účinek mezi úrovní dávkování látky F14512 [mg/kg] a počtem neutrofilů [medián počtu neutrofilů v čase]. Léčivo F14512 bylo podáváno v prvních třech dnech.

Během další studie F14512 byly provedeny rozsáhlé simulace a molekulární modelování topII/DNA komplexu (přesněji topII/DNA cleavage complexu; topII/DNAcc) vázaného na etoposid (systém ETOcc) a F14512 (systém F14cc)¹⁴⁷. Byly tak identifikovány vlastnosti závislé na těchto systémech a klíčové interakce mezi topII/DNA receptorem a F14512 nebo etoposidem. E-kruh je v případě obou látek stabilní díky vodíkovým vazbám s Asp479 zachovaným pro 82,6% a 78,7% doby simulace v ETOcc a F14cc. V této pozici E-kruh pravděpodobně podporuje narušení koordinační sféry kovových iontů v topII a blokuje tak topII-zprostředkovanou DNA religaci (připojení konců DNA znovu dohromady)¹⁴⁸⁻¹⁵⁷. Jádro aglykonu je také velmi stabilní v obou systémech. F14512 udržuje pevnou interakci zachovanou pro 96,6% času simulace mezi dusíkem N1 a DNA bází G₊₅. Ačkoliv jádro aglykonu zůstává mezi bázemi T₊₁/A₊₄ a C₋₁/G₊₅ (jak v ETOcc, tak v F14cc), nevytváří typické vertikální interakce s těmito bázemi. To je způsobeno díky zachování jeho nakloněné orientace k DNA a lokálnímu rozšíření štěpeného DNA vlákna. Tento neinterkalativní způsob

vazby léčiva k DNA koresponduje s předchozími výsledky strukturálních a biofyzikálních studií^{149,158}.

Během molekulárně-dynamických (MD) simulací byla pozorována klíčová konformační mobilita F14512 sperminového řetězce s průměrnou kvadratickou odchylkou odpovídající hodnotě $1,88 \pm 0,36$ Å. Dlouhý polyaminový řetězec se rozprostírá směrem do velkého žlábků a interaguje s fosfáty obou řetězců DNA. Dusíkové atomy N^{13} a N^{17} jsou klíčovými pro vazbu s DNA. N^{13} interaguje především s DNA fosfáty C_{+6} a C_{-6} . N^{17} interaguje s fosfáty C_{+6} a G_{-7} , ale váže se také vodíkovými vazbami na Glu953 a Glu519, které jsou lokalizovány v blízkosti DNA. Tyto přechodné interakce se vyskytují u obou řetězců se srovnatelnou statistickou distribucí. N^8 se také podílí na ukotvení sperminového řetězce k DNA svou interakcí s G_{+5} . N^4 přispívá pouze okrajově ke stabilizaci léčiva v topII/DNAcc. Síť vodíkových vazeb odráží příznivou komplementaritu F14512 k topII/DNAcc. Etoposid takovou síť vodíkových vazeb tvořit nedokáže. Jeho glykosidická část v pozici C^4 je velmi stabilní, interaguje s karbonylem G_{+5} (71,4% času simulace), vyčnívá směrem k DNA velkému žlábků a zůstává stabilně v blízkosti Gln778 a Met782. Dále existují podobné hydrofóbní interakce mezi léčivem a proteinem jak v systému ETOcc, tak F14cc¹⁵³.

Zdá se, že těsnější vazba F14512 je způsobena hlavně díky sperminovému řetězci, který vytváří prostřednictvím velkého žlábků příznivé interakce léčiva s DNA i topII. Silnější interakce F14512 s topII/DNAcc byla potvrzena pomocí řízených MD simulací. Rozsáhlé MD simulace naznačily klíčové interakce léčiva s molekulárním cílem, čímž byla objasněna zvýšená účinnost F14512 jako inhibitoru topoizomerázy II. Bylo demonstrováno, že polyaminový řetězec se váže lépe na topII/DNAcc než na samotnou DNA¹⁵³.



Obr. č. 12: Klíčové interakce mezi F14512 a topII/DNA cleavage komplexem

3.5. Syntéza *N*-alkylovaných polyaminů, aminů a jejich analog

Bylo vyvinuto mnoho přístupů pro syntézu polyaminových analog a konjugátů. Redukce nitrilů, azidů, amidů a řada alkylačních metod byly aplikovány při syntéze v roztoku a většinu z těchto způsobů příprav lze využít také při syntéze na pevné fázi. Při těchto syntetických metodách lze využít selektivní funkcionalizaci/protekcí aminoskupin v polyaminovém řetězci či postupnou výstavbu požadované molekuly. Syntéza na pevné fázi umožňuje přípravu polyaminového řetězce buďto lineární strategií nebo výstavbou polyaminu od centra základní struktury, což umožňuje možnosti modifikace na obou koncích polyaminu¹⁵⁹⁻¹⁶².

Pro přímou selektivní protekcí aminoskupin v polyaminech se využívá několika chránících skupin, jako jsou například ftalyl (Pht), benzyloxykarbonyl (Cbz), *tert*-butyl karbamát (Boc) a další. Nepřímá protekce primárních aminů spočívá v chránění všech aminoskupin například nejprve sulfochloridy (TsCl, MtsCl, NsCl) nebo Boc s následnou alkylací alkylhalidy. Následné odstranění protektivních skupin vede k tvorbě bis-alkylovaných polyaminů. Nicméně sterické bránění protektivních skupin může zabránit reakci se sekundárními a terciárními alkylhalidy. Chránění sekundárních aminoskupin lze provést přímo pomocí kovových komplexů nebo se dočasně ochrání primární aminoskupiny. Sekundární aminy oddělené od dalších aminoskupin propylenovou částí mohou být ochráněny například reakcí s aldehydy za vzniku příslušných hexahydropyrimidinů¹⁵⁹⁻¹⁶³. Existuje však mnoho dalších protektivních skupin¹⁶⁴.

Pro postupnou výstavbu polyaminového skeletu se používají přístupy Michaelovy adice, přímé *N*-alkylace primárních aminů, Fukuyama a Mitsunobu alkylace, redukční alkylace a jiné, o kterých bude nyní pojednáno.

Michaelova adice diaminů na akrylonitril je jednou z nejstarších metod využívající se k rozšiřování polyaminového řetězce. Následná redukce nitrilové skupiny vede k tvorbě aminopropylových zbytků na jednom či obou koncích diaminu. Tato metoda umožňuje modifikace tetramethylenového řetězce například u sperminu nebo spermidinu a také prodlužování řetězce s několika aminopropylovými skupinami. Bohužel při adici zahrnující primární aminy může docházet k tvorbě mono- nebo bis-kyanoalkylovaných derivátů. Nicméně bis-alkylace bylo využito při syntéze lineárních a rozvětvených polyaminů. Takto byly připraveny například *N*-alkyl-bis(3-aminopropyl)aminy, kdy byl bis-alkylovaný derivát adován na akrylonitril s následnou redukcí¹⁶⁵.

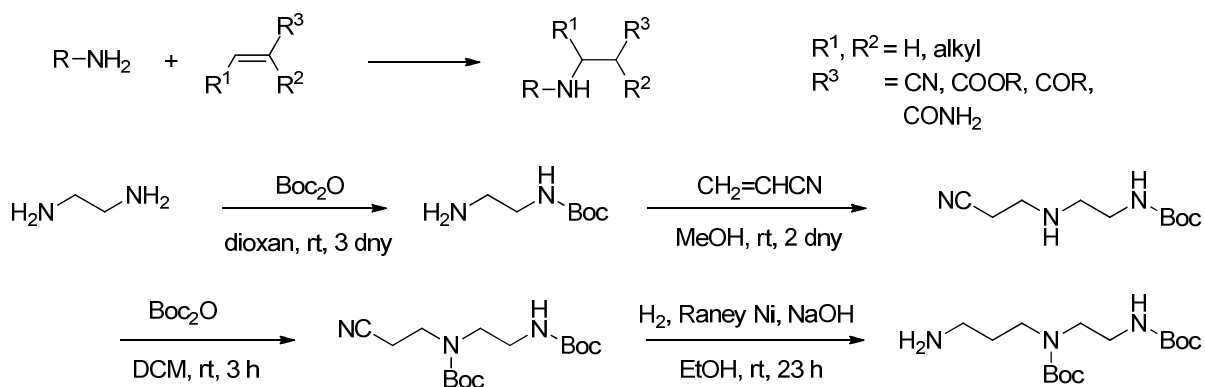


Schéma č.1: Příklady Michaelovy adice

Přímá *N*-alkylace primárních aminů je nejběžnější metodou přípravy sekundárních polyaminů. Je známo, že při tomto přístupu často dochází k overalkylaci a ke vzniku směsí. Polyaminy však byly připraveny reakcí alkyhalidů s velkým nadbytkem primárního diaminu. V takovém případě lze docílit preferenční tvorby sekundárních aminů. Vliv na zamezení overalkylace může mít také teplota, reakční čas či přítomnost skupin v okolí aminoskupiny, které mohou stéricky bránit tuto jinak reaktivnější část molekuly. K alkylaci vhodných aminů mohou být použita i jiná činidla než alkyhalidy a to například bromo- či chloro- nitrily, *N*-(bromoalkyl)ftalimidy, alkoholy s kovovými katalyzátory nebo sulfonáty, oxirany, alkylfosfáty či alkylfosfity¹⁶⁰⁻¹⁶².

Alkylace sulfonamidů jako je Fukuyama alkylace představuje účinnou syntetickou metodu přípravy sekundárních polyaminů jak v roztoku, tak na pevné fázi¹⁶⁶. *MtsNH*-, *TsNH*-, trifluoromethansulfonamidy, 2-nitrobenzensulfonamidy (*NsNH*-), 4-nitrobenzensulfonamidy a 2,4-dinitrobenzensulfonamidy mohou být alkylovány buď klasicky alkyhalidy, či alkoholy za podmínek Mitsunobu alkylace. Při Mitsunobu alkylaci dochází ke kondenzaci mezi kyselým protonem sulfonamidu a primárním či sekundárním alkoholem v přítomnosti DEAD a PPh_3 . Lze také využít jiných činidel užívaných při syntéze za podmínek Mitsunobu alkylace a to *N,N,N',N'*-tetramethylazodikarboxamidu, 1,1'-(azodikarbonyl)dipiperidinu (ADDP) a tetraizopropylazodikarboxamidů. Produktem je nejprve terciární sulfonamid, ze kterého lze získat požadovaný sekundární amin užitím thiolu a báze¹⁶².

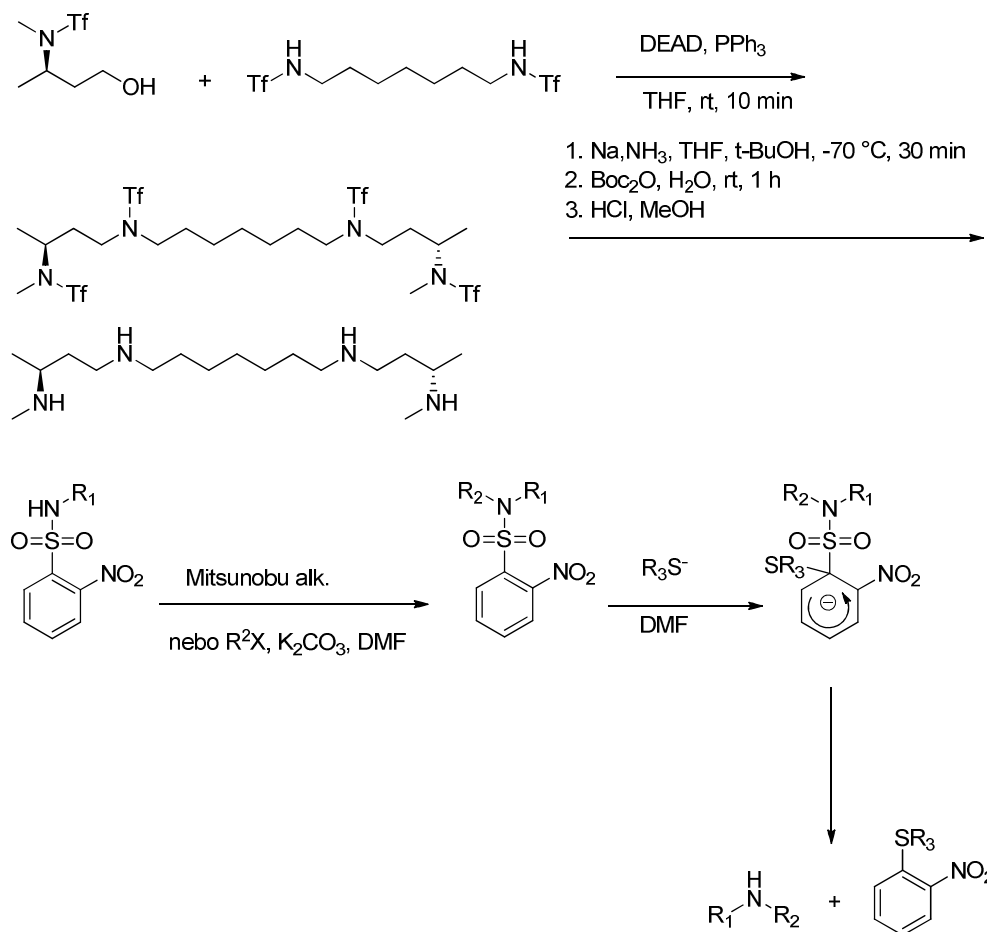


Schéma č. 2: Příklady Mitsunobu a Fukuyama alkylace

Reakcí primárních aminů a karbonylů je možno připravit iminy (Shiffovy báze), které mohou být následně redukovány na substituované aminy. Iminy mohou být také připraveny aza-Wittigovou reakcí, tedy reakcí azidu s PPh₃ s následnou adicí aldehydu. Bohužel není snadné získat čisté iminy a to z důvodu jejich nízké stability. Reakce aminu s aldehydy či ketony v přítomnosti redukčního činidla (NaBH₄, NaBH₃CN, NaB(OAc)₃H) se nazývá reduktivní aminace. Možná overalkylace může být eliminována volbou molárních poměrů, kdy se přidává do reakce méně než 1eq. aldehydu. Reduktivní alkylaci lze provést také při syntéze na pevné fázi¹⁶¹.

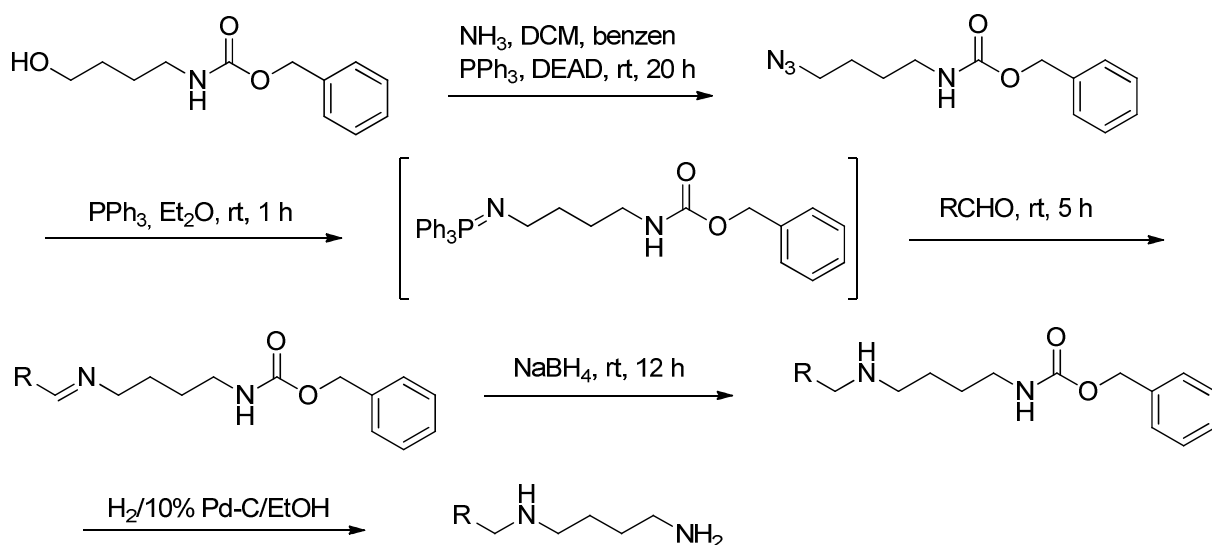


Schéma č. 3: Příklad aza-Wittigovy reakce

Redukce amidů, azidů a nitrilů poskytuje jednoduchou metodu jak začlenit aminy do polyaminového řetězce. Prodlužování polyaminového řetězce může být provedeno acylací aminů aktivovanou karboxylovou kyselinou s následnou redukcí získaného amidu. Nejčastěji používaná redukční činidla jsou LiAlH_4 nebo $\text{BH}_3\text{-THF}$ ¹⁶⁰. Redukce nitrilů na aminy se obvykle provádí katalytickou hydrogenací za použití činidel jako jsou například PtO_2 , Raney-Ni nebo LiAlH_4 . Tvorba vedlejších produktů během této reakce může být eliminována přidávkou amoniaku a anorganických bází (NaOH , LiOH). Dále přidávkou velkého nadbytku LiAlH_4 lze minimalizovat tvorbu sekundárních a terciárních aminů¹⁶⁵. Redukci azidů lze provádět za mírných podmínek - např. hydrogenací (za použití Lindlarova katalyzátoru, Raney-Ni nebo Pd), redukcí s $\text{BH}_3\text{-THF}$ nebo Staudingerovou reakcí (PPh_3 , voda).

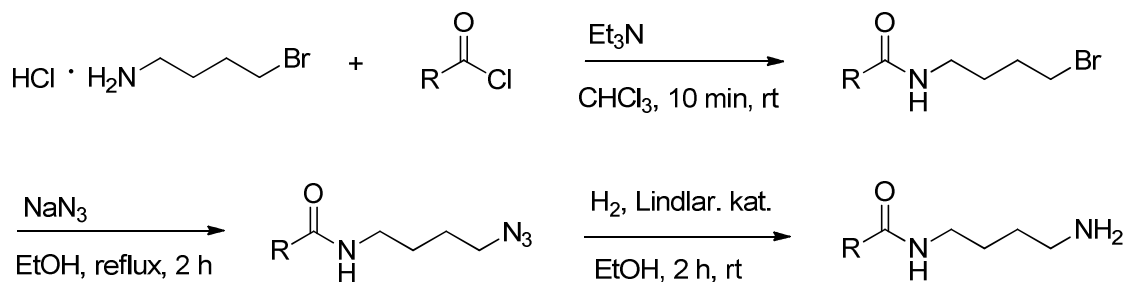
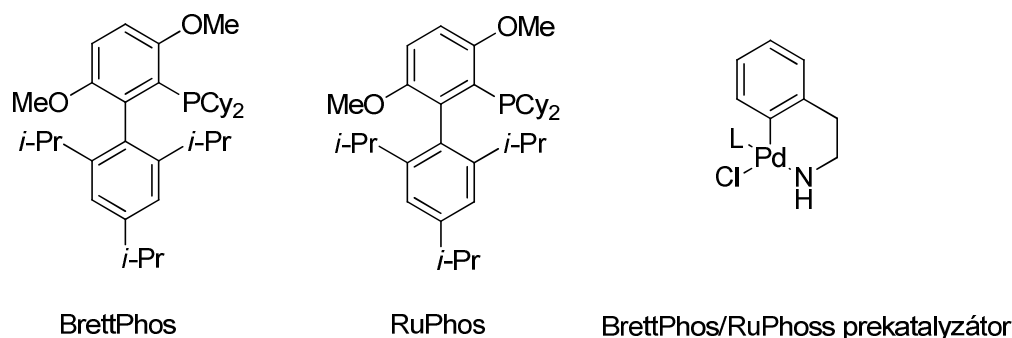


Schéma č. 4: Příklad redukce azidu za použití Lindlarova katalyzátoru

V nedávné době byly studovány Pd-katalyzované C-N crosscouplingové reakce primárních, sekundárních alkylaminů či anilinů s aromatickými halogenderiváty a mesylderiváty s využitím biarylmonofosfinových ligandů jako jsou BrettPhos a RuPhoss^{167,168}. Tyto ligandy bývají také součástí Pd-prekatalyzátoru uvedeného na obrázku (obr. č.13). BrettPhos je používán pro primární aminy, RuPhos pro sekundární aminy, stejně tak jejich příslušné prekatalyzátory. Tyto katalytické systémy se vyznačují nižším loadingem katalyzátoru a často také kratší reakční dobou.



Obr. č. 13: *Biarylmonofosfinové ligandy včetně prekatalyzátoru*

Ukázalo se, že BrettPhos-prekatalyzátor je účinným při reakci substituovaného arylhalidu s methylaminem a že s vysokou selektivitou vzniká aromatický methylamin (<97:3, MeNHAr:MeNAr₂).

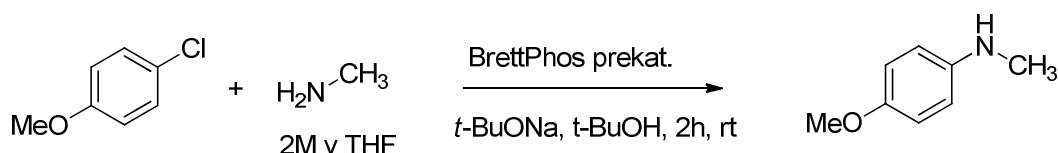


Schéma č.5: *Reakce arylhalidu s methylaminem za využití BrettPhos-prekatalyzátoru*

Vyšší chemoselektivita vůči primárním aminům v porovnání se sekundárními byla pozorována také na reakci substituovaného anilinu s arylhalidem (selektivita >40:1).

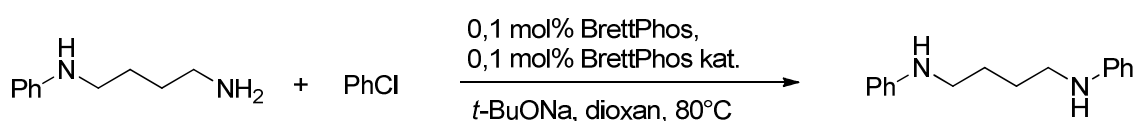


Schéma č.6: *Reakce substituovaného anilinu s arylhalidem*

4. Diskuze a dosažené výsledky

4.1. Syntéza prekurzorů

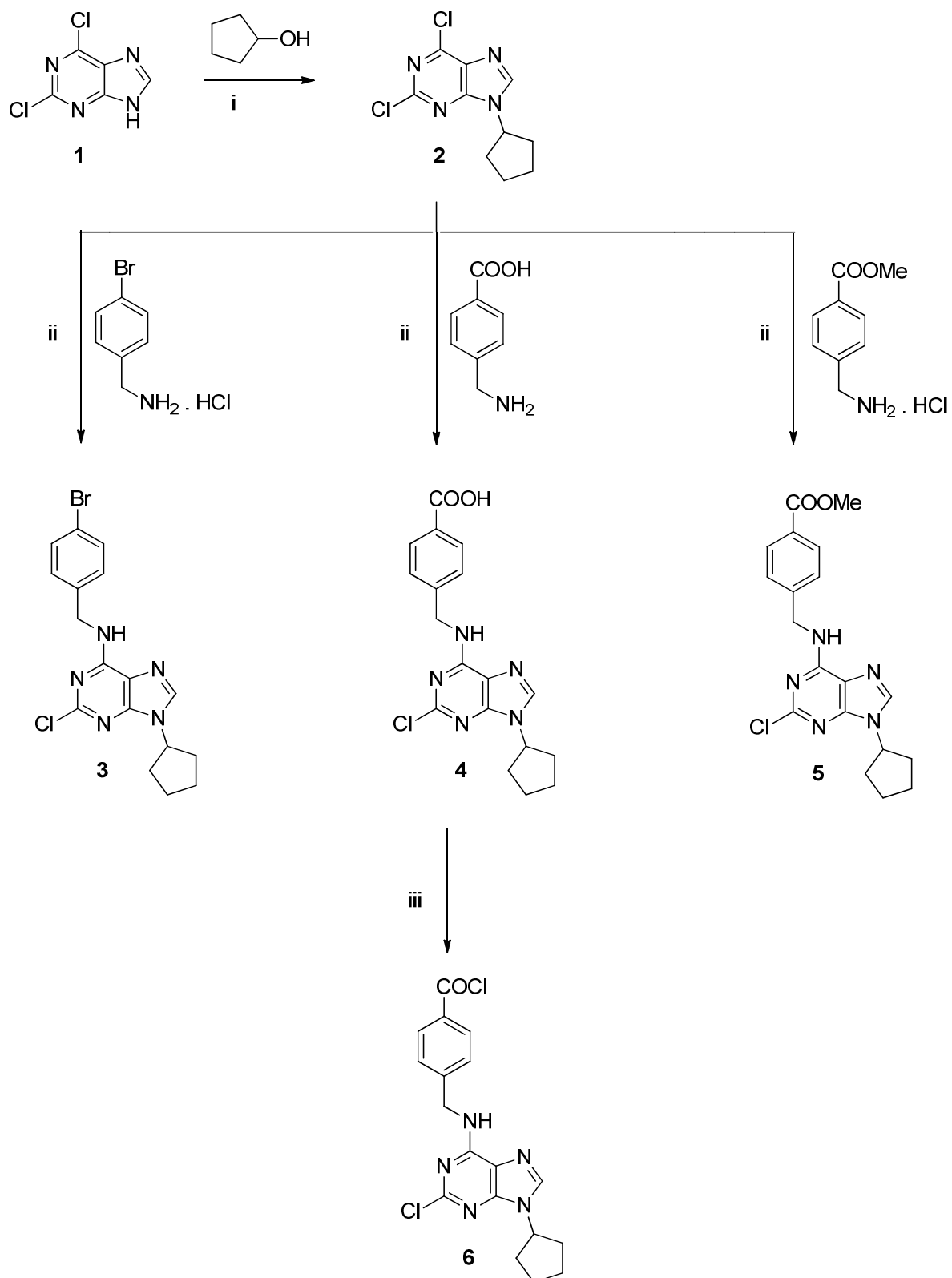
4.1.1. Prekurzory benzylaminového typu

Syntéza veškerých derivátů 2,6,9-trisubstituované purinové řady byla zahájena reakcí komerčně dostupného 2,6-dichlorpurinu s cyklopentanolem v suchém THF za podmínek Mitsunobu alkylace. Substitucí purinového jádra v pozici N^9 - byl získán produkt 9-cyklopentyl-2,6-dichlor-9*H*-purin s 90% regioselektivitou vůči poloze N^9 -purinu. Vedlejší produkt trifenyfosfin oxid byl odstraněn krystalizací z toluenu. Protože při této alkylační reakci vzniká směs N^7 - a N^9 - izomerů, byla provedena krystalizace 9 N^9 - izomeru z ethanolu.

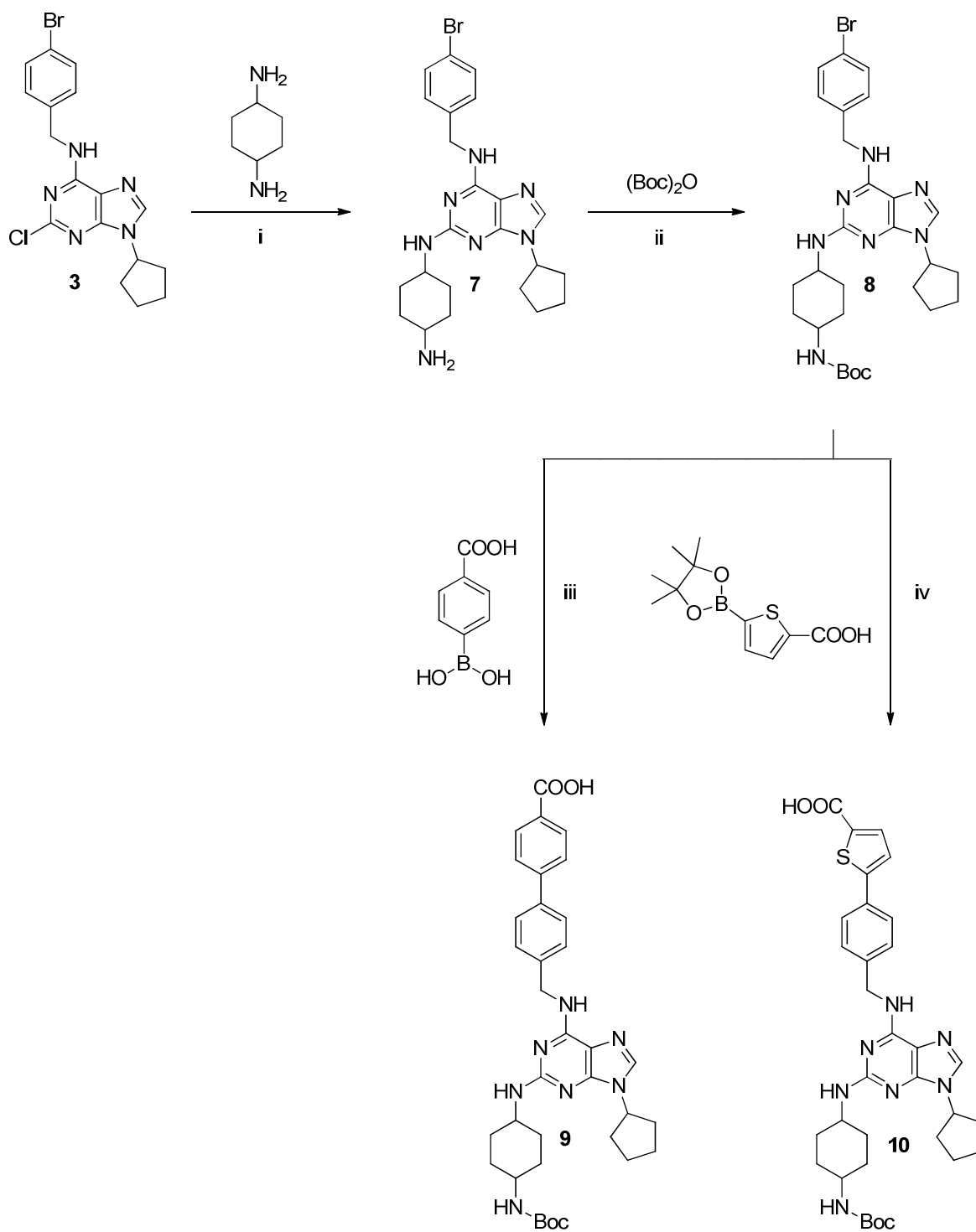
Deriváty **3**, **4** a **5** byly získány S_N2 reakcí v pozici C^6 - purinového jádra s příslušnými benzylaminovými deriváty a to za stejných reakčních podmínek. Derivát **3** byl izolován extrakcí do ethylacetátu, látka **4** krystalizací z vody. Všechny tyto produkty byly v krystalické formě bílé barvy a byly použity do dalších reakčních stupňů. Za účelem zvýšit reaktivitu byl připraven chlorid kyseliny reakcí volné monoarylové kyseliny **4** s thionylchloridem.

Látka **3** byla dále podrobena reakci s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem. Tato reakce byla provedena v malém množství ethylenglykolu při zahřívání olejové lázně na 160 °C. Reakci vedoucí k produktu **7** lze provést také přímým tavením, nicméně reakce v ethylenglykolu je z hlediska výtěžků a čistoty produktu příznivější. Volná aminoskupina derivátu **7** byla následně ochráněna butoxykarbonylovou skupinou (Boc) reakcí s di-*tert*-butyl-dikarbonátem. Produkt **8** byl izolován extrakcí do dichlormethanu a jedná se o jeden z finálních prekurzorů pro monoarylové konjugáty vázané jako aminy (viz syntéza konjugátů).

Protože cílem práce byla příprava nejen monoarylových prekurzorů, byly připraveny také biarylové deriváty za podmínek Suzuki couplingu reakcí látky **8** s kyselinou 4-karboxyfenylboronovou nebo s pinacol esterem kyseliny 5-karboxythiofen-2-boronové. V obou případech byla reakční směs odpařena na RVO a následně byly tyto odparky suspendovány ve vodě, okyseleny definovaným množstvím kyseliny (1M HCl v případě látky **9** nebo CH₃COOH v případě látky **10**), vysráženy a zfiltrány.



(i) PPh_3 , DIAD, THF; (ii) DIPEA, *n*-propanol, 4 h, 120 °C, i. atm.; (iii) SOCl_2 , 1,2-dichloroethan, py, 85 °C

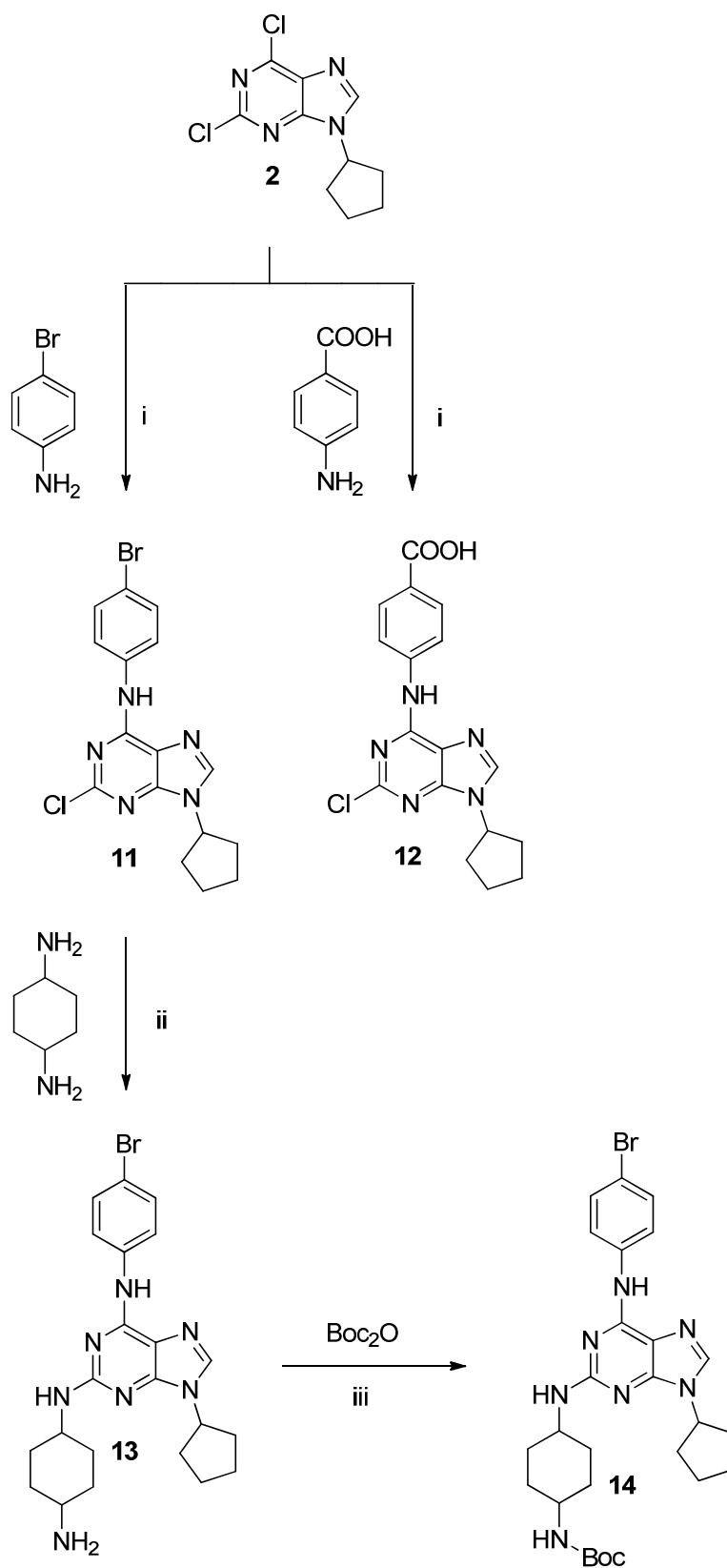


(i) ethylenglykol, 4 h, 160 °C, i.atm.; (ii) NaHCO_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, 3 h, rt; (iii) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , EtOH , 24 h, 120 °C, i.atm.; (iv) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, NaHCO_3 , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 24 h, 120 °C, i. atm.

4.1.2. Prekurzory anilinového typu

Prekurzory anilinového typu byly připraveny obdobně jako prekurzory benzylaminového typu. Produkt **11** byl připraven reakcí 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9*H*-purinu s 4-bromanilinem za použití Hünigovy báze. Produkt byl získán extrakcí do dichlormethanu s následnou rekrystalizací z absolutního ethanolu. Tento produkt by bylo možno použít pro konjugaci s příslušným polyaminem s následnou substitucí do polohy C²- s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem, putrescinem či jinými vhodnými substituenty. Nicméně tento produkt byl nejprve substituován v poloze C²- a až následně konjugován s chráněným putrescinem (viz syntéza konjugátů), čímž byl proveden neuniverzální syntetický přístup. Látka **11** byla tedy podrobena substituci nukleofilní 2. Tato reakce byla provedena přímým tavením látky **11** s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem. *Trans*-1,4-diaminocyklohexanu bylo použito dvacetinásobné množství. Produkt byl izolován extrakcí do ethylacetátu. Následně byla látka **13** chráněna butoxykarbonylovou skupinou z důvodu následující syntézy (viz syntéza konjugátů). Do budoucna by bylo vhodné využít také přístup univerzální, tedy nejprve provést konjugaci a až poté substituci nukleofilní do pozice C²- purinu a získat tak řadu derivátů s odlišnými substituenty v pozici C²-.

Derivát **12** byl připraven obdobně jako derivát **4**, reakce se lišila především v reakční době (20 hodin). Surový produkt byl suspendován ve vodě a získaný pevný podíl byl zfiltrován. Tento derivát byl navržen pro univerzální syntetický přístup přípravy konjugátů s odlišnými substituenty v pozici C²-.



(i) DIPEA, *n*-propanol, 20 h, 120 °C, i. atm.; (ii) 7 h, 160 °C, i. atm.; (iii) NaHCO₃, 24 h, rt

4.1.3. Polyaminové prekurzory

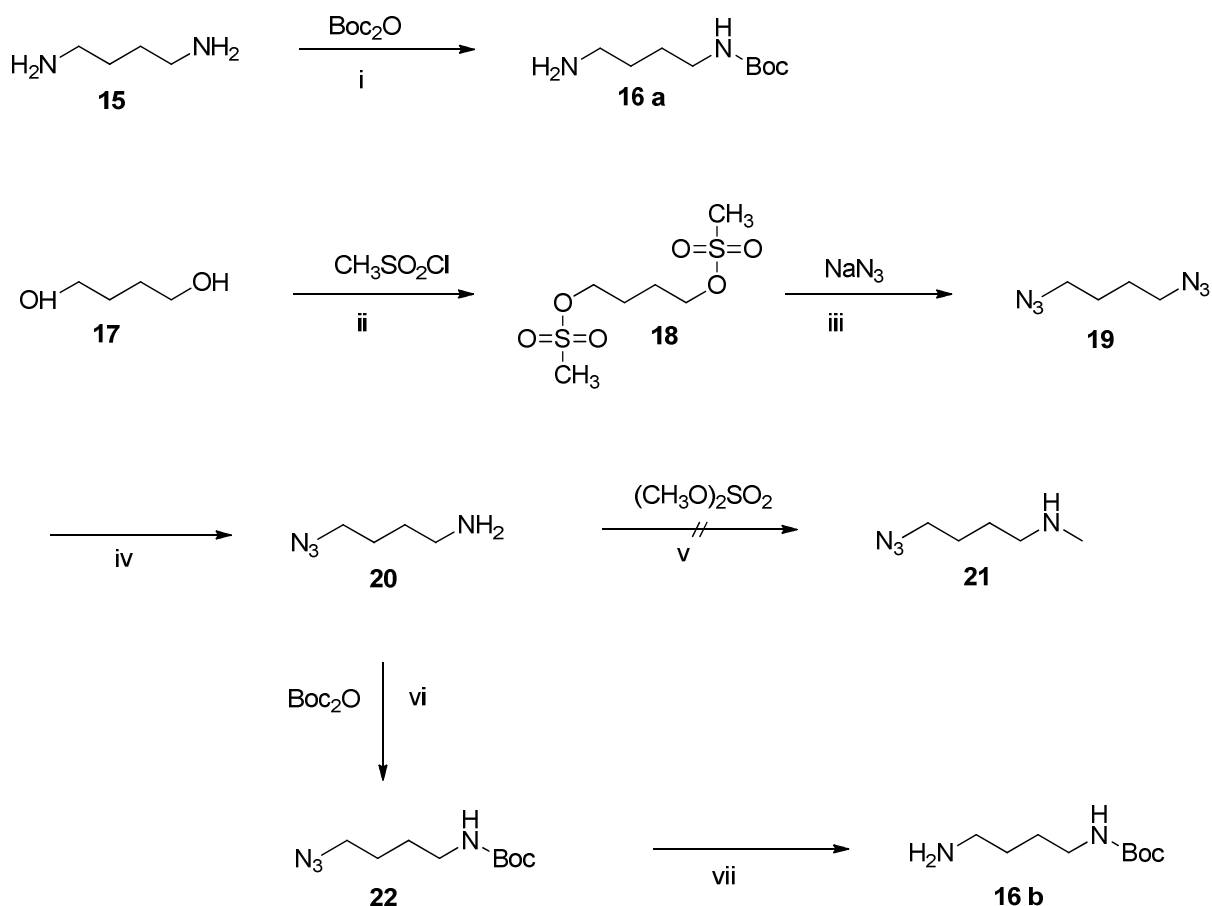
Pro porovnání biologické aktivity a metabolické stability byly připraveny methylované polyaminy a nemethylovaný monochráněný putrescin. Předpokládá se, že by konjugáty s methylovanými polyaminy měly vykazovat vyšší metabolickou stabilitu.

4.1.3.1. Nemethylovaný prekurzor

Syntéza monochráněného putrescinu byla provedena dvěma cestami. Nejprve byla provedena jednoduchá jednokroková syntéza, kdy byl putrescin reagován s di-*terc*-butyl dikarbonátem (0,10 eq.) v prostředí chloroformu. Produkt se sice podařilo izolovat, nicméně výtěžek byl velmi nízký (9 %). Tento derivát byl připraven jiným způsobem s již mnohem vyšším výtěžkem (98 %).

Byla provedena vícekroková syntéza vycházející z 1,4-butandiolu. Butan-1,4-diyl dimethansulfonát byl připraven reakcí 1,4-butandiolu s methansulfonylchloridem v prostředí suchého tetrahydrofuranu a triethylaminu. Následovala reakce vedoucí k produktu **19** (1,4-diazidobutanu). Ten byl připraven jednoduše reakcí butan-1,4-diyl dimethansulfonátu (**18**) s azidem sodným. Poté byla provedena parciální redukce připraveného diazidu ve dvoufázovém prostředí - 1M HCl a diethyletheru. K této směsi byl postupně přikapáván roztok diethyletheru s PPh₃.

Byla vyvinuta snaha o methylaci produktu **20**, nicméně methylace s dimethylsulfátem nebyla úspěšná. Přístupy k přípravě methylovaných derivátů byly nakonec provedeny jinou cestou (viz methylované prekurzory) Produkt **20** byl tedy ochráněn skupinou Boc a následně byl redukován H₂/Pd-C v methanolu.

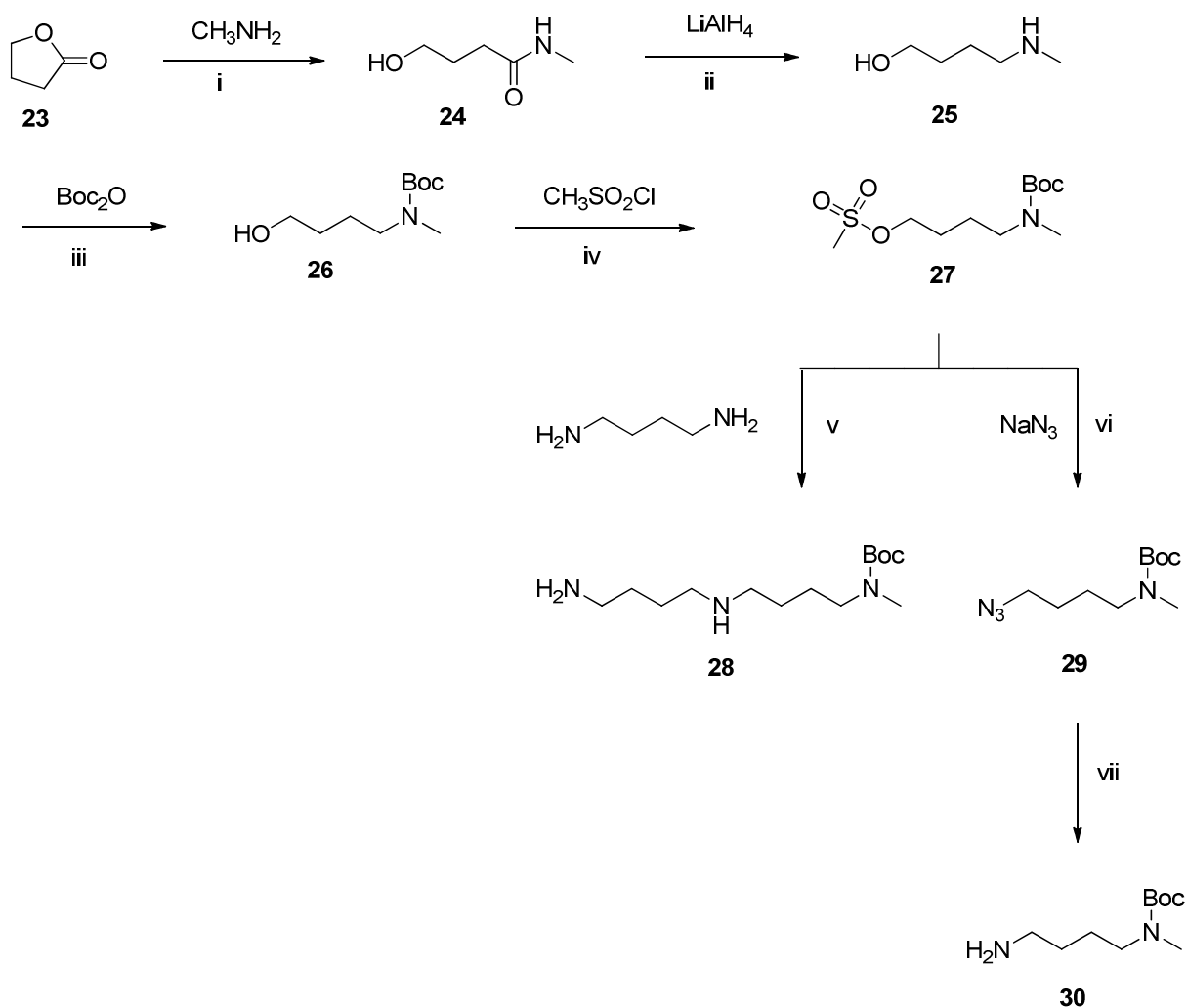


(i) CHCl_3 , 2 h, rt; (ii) Et_3N , 16 h, rt; (iii) DMF , 80°C , 14 h, i. atm., (iv) PPh_3 , $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, Et_2O ; (v) Et_2O , 0°C ; (vi) NaHCO_3 , THF , 24 h, rt; (vii) H_2/Pd , MeOH , 2h, rt

4.1.3.2. Methylované prekurzory

Syntéza methylovaných polyaminů byla zahájena rozkladem γ -butyrolaktonu methylaminem (40% vodný roztok). Připravený 4-hydroxy-*N*-methylbutanamid byl dále redukován redukčním činidlem LiAlH_4 v suchém tetrahydrofuranu. Získaný produkt **25** byl ochráněn skupinou Boc a následně byla provedena reakce s methansulfonylchloridem vedoucí k přípravě látky **27**. Tato látka byla dále použita pro přípravu jak symetrického polyaminu **28**, tak pro přípravu methylovaného putrescinu **30**. Polyamin **28** byl připraven reakcí látky **27** s putrescinem v prostředí acetonitrilu.

Uhličitan draselný byl použit jako báze. Ten byl po ukončení reakce zfiltrován a reakční směs byla odpařena. Odparek byl následně rozdělen mezi dichlormethan a nasycený vodný roztok uhličitanu sodného. Extrakce nasyceným vodným roztokem uhličitanu sodného byla provedena šestkrát z důvodu odstranění nezreagovaného putrescinu ze směsi. Produkt **30** byl získán reakcí látky **27** s azidem sodným s následnou Staudingerovou redukcí.



(i) 0-5 °C, 2 h; (ii) LiAlH_4 , THF (0-5 °C, 1 h, i.atm.)/reflux (2 h, i.atm.), 15% NaOH (0-5 °C), 2 h, rt.; (iii) Et_3N , MeOH, 24 h, rt, i. atm., (iv) Et_3N , DCM, 24 h, rt, i. atm., (v) AcCN, K_2CO_3 , 95 °C, 24 h, i. atm.; (vi) DMF, 80 °C, 24 h, i. atm.; (vii) PPh_3 , H_2O , Et_2O , 24 h, i.atm.

4.1.4. Konjugáty

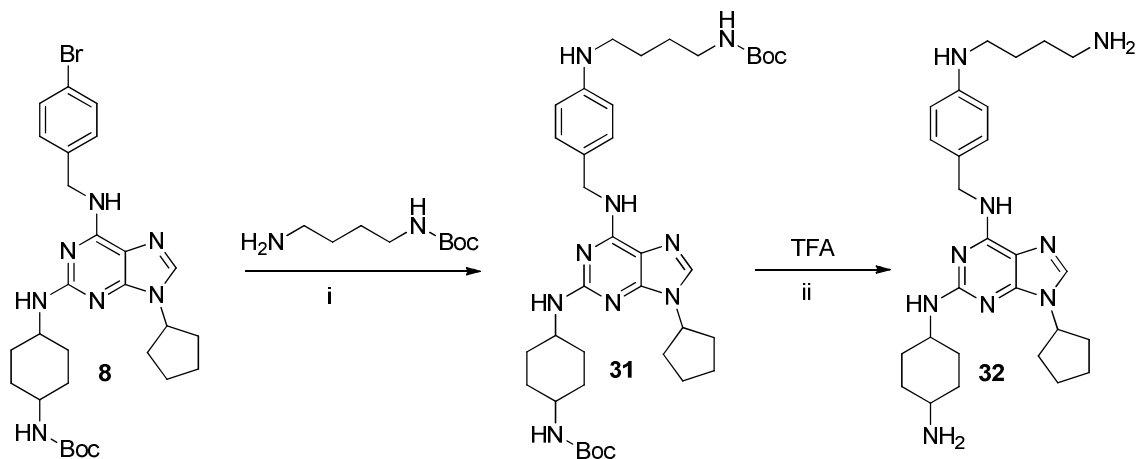
Z dřívějších studií SAR je zřejmé, že nejvhodnějším místem pro spojení 2-aminocykloalkyl-6-aryl(heterobiaryl)amino-9-cykloalkyl-9*H*-purinových derivátů s vybraným polyaminem je *para*- poloha aromatického zbytku v pozici 6 purinového jádra. Prodloužení substituentů v poloze 2- stejně jako v poloze 9- snižuje afinitu k aktivnímu místu v CDK. Z hlediska organické syntézy je výstavba *para*- polohy aromatické části purinového prekursoru poměrně snadná. Konjugáty s polyaminy jsou navrženy jako sekundární aminy nebo amidy.

4.1.4.1. Monoarylové konjugáty vázané jako aminy

Byly připraveny monoarylové deriváty vázané s methylovaným i nemethylovaným putrescinem přímo přes aminoskupinu. Pro konjugaci 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s putrescinem byly zvoleny podmínky Buchwald-Hartwigovy aminace. V tomto případě bylo nutno optimalizovat reakční podmínky. V případě nemethylovaného putrescinu byly odzkoušeny různé katalyzátory, byly změněny molární poměry reaktantů a také byly odzkoušeny 2 báze - *t*-BuOK a *t*-BuONa. Výtěžky reakce v přítomnosti *t*-BuONa nepřesáhly hodnotu 10 % ani po prodloužení reakční doby, nicméně za použití *t*-BuOK bylo zdárně dosaženo požadovaných produktů **31** a **33**, jež byly v prostředí dichlormethanu ochráněny kyselinou trifluoroctovou. Jako ligand pro Buchwald-Hartwigovu aminaci byl zvolen *rac*-BINAP a jako rozpouštědlo suchý toluen. Katalyzátory a molární poměry reaktantů včetně výtěžků a reakční doby jsou uvedeny v tabulce. Optimalizace reakčních podmínek byla provedena na reakci derivátu **8** s monochráněným putrescinem.

Je nutno zmínit, že optimalizované podmínky uvedeny výše byly vhodné pro konjugaci s monochráněným putrescinem č nechráněným putrescinem. V případě methylovaného konjugátu bylo nutno podmínky dále optimalizovat, jelikož v přítomnosti *rac*-BINAP se nepodařilo dosáhnout cílového konjugátu **35**. Pro přípravu tohoto konjugátu byl zvolen BrettPhos Pd-prekatalyzátor. Reakce byla provedena jak v přítomnosti *t*-BuOK, tak *t*-BuONa. Ukázalo se, že báze *t*-BuONa je z hlediska konverze (13% výchozí látky za použití *t*-BuONa, 24% výchozí látky v případě *t*-BuOK) v tomto

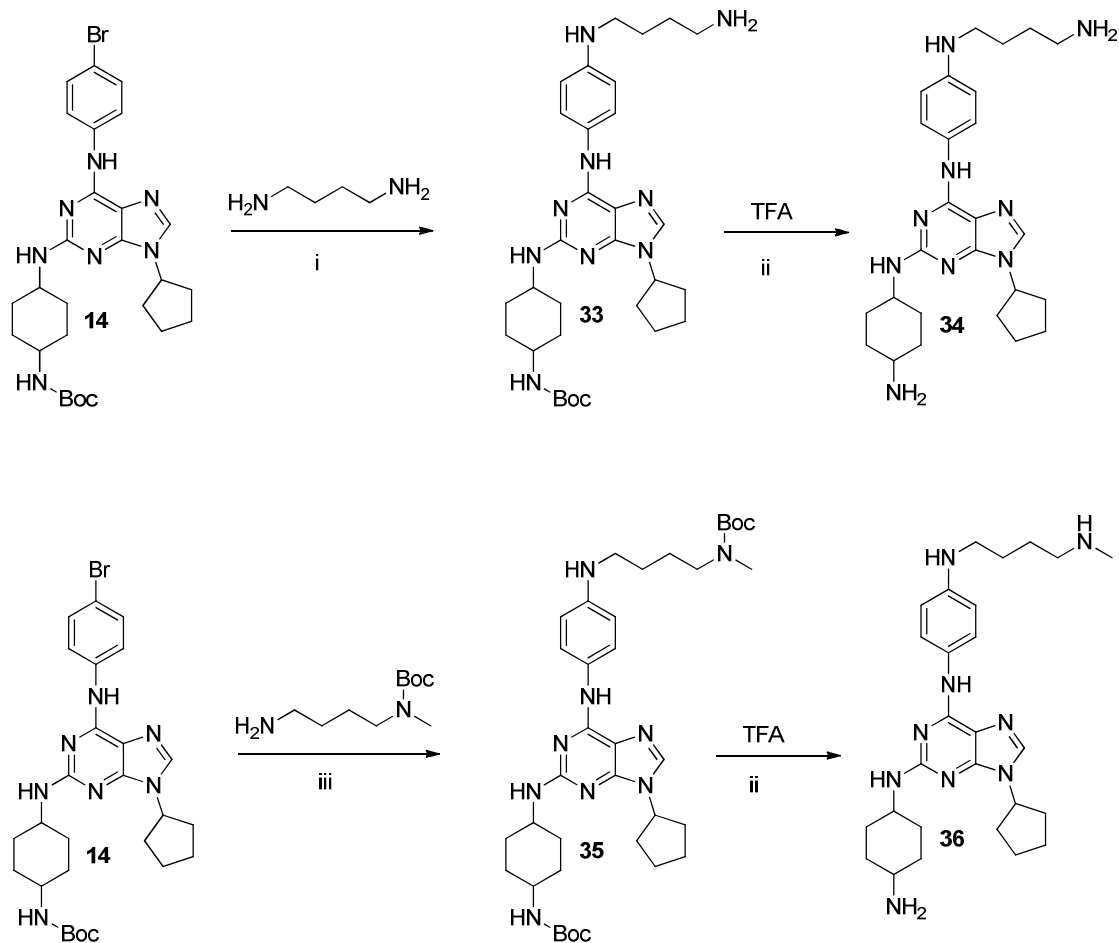
případě vhodnější. Do budoucna je třeba definovat podmínky pro čištění tohoto produktu. Bylo odzkoušeno několik mobilních fází toluen-ethylacetát (1:1), chloroform-methanol (40:1; 19:1; 4:1) a samotný chloroform, nicméně hodnota retenčního faktoru produktu byla vždy velice blízká výchozí látce.



(i) toluen, rac-BINAP, Pd(dba)₂, *t*-BuOK, 80 °C, 24 h, i.atm., (ii) DCM, 2 h,

N	diamin	Báze	rozpuštědlo	Ligand	Katalyzátor (0,04eq.)	T [°C]	Výtěžek [%]	Reakční čas[h]
1	Boc-putrescin 1,15eq.	t-BuONa 1,15eq.	toluen	Rac-BINAP 1,15eq.	Pd₂(dba)₃ 0,05eq.	80	< 10	3
2	Boc-putrescin 1,15eq.	t-BuONa 1,5eq.	toluen	Rac-BINAP 0,08eq.	Pd₂(dba)₃ 0,04eq.	100	< 10	24
3	Boc-putrescin 1,15eq.	t-BuONa 1,5 eq.	toluen	Rac-BINAP 0,08eq.	Pd(OAc)₂ 0,04eq.	100	< 10	24
4	Boc-putrescin 1,15eq.	t-BuOK 1,5 eq.	toluen	Rac-BINAP 0,08eq.	Pd₂(dba)₃ 0,04eq.	100	76	24
5	Boc-putrescin 1,15eq.	t-BuOK 1,5eq.	toluen	Rac-BINAP 0,08eq.	Pd(dba)₂ 0,04eq.	100	93	24

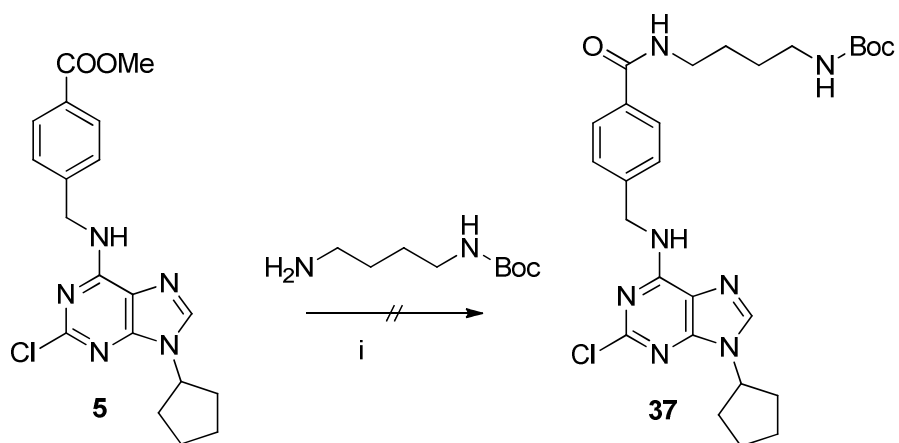
Tabulka č. 4: *Optimalizace reakčních podmínek Buchwald-Hartwigovy aminace*



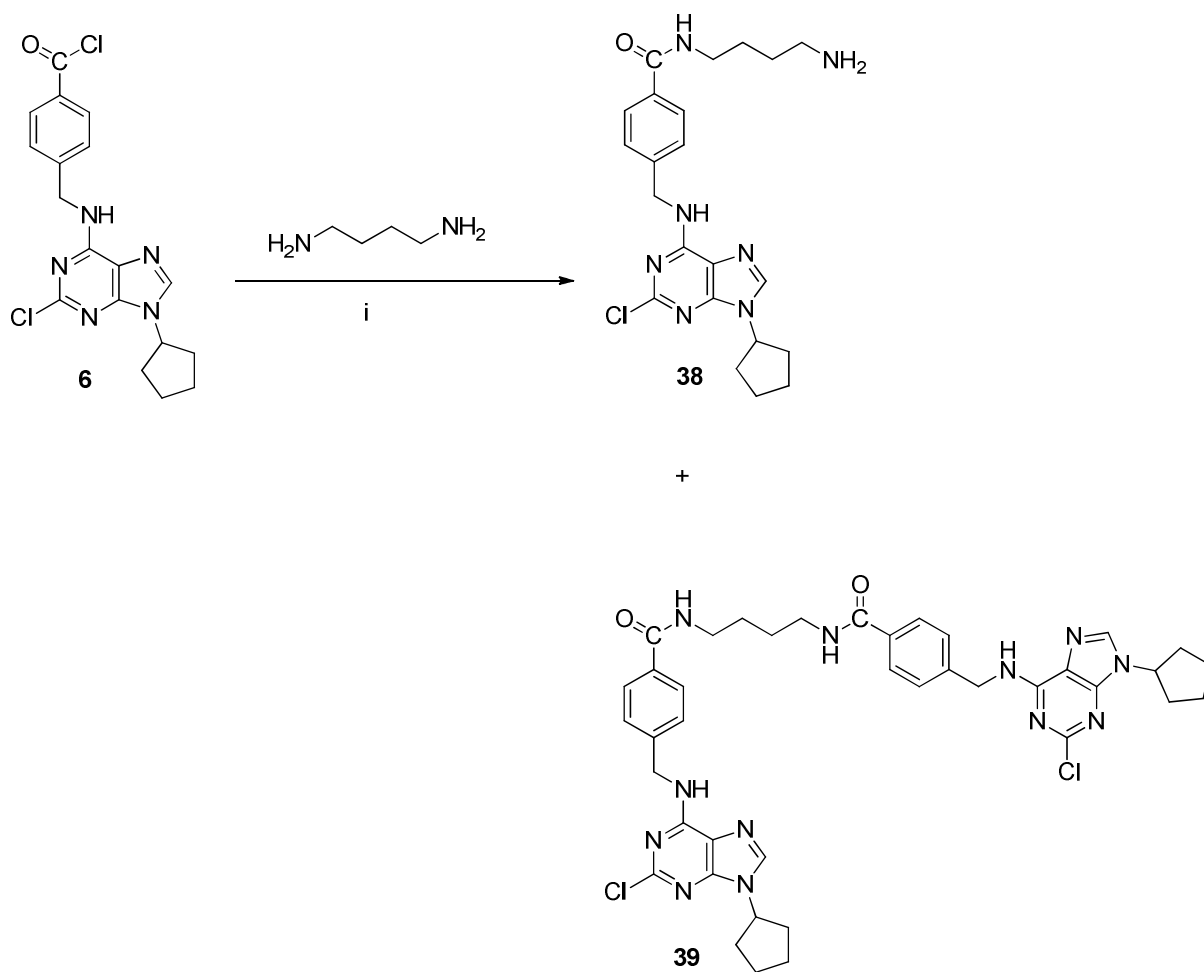
(i) toluen, rac-BINAP, Pd(dba)₂, *t*-BuOK, 80 °C, 24 h, i.atm., (ii) DCM, 2 h, (iii) THF, BrettPhos, *t*-BuONa, 80 °C, 24 h

4.1.4.2. Monoarylové konjugáty vázané jako amidy

Za účelem připravit konjugáty vázané jako amidy byly odzkoušeny 3 metody. Nejprve byla provedena reakce monoarylového esteru s chráněným putrescinem. Bohužel reakce neprobíhala s předpokládanou konverzí. Výtěžek byl velmi nízký (<10%) a majoritní peak zjištěn metodou HPLC-MS byl zastoupen výchozí látkou. Proto byl zvolen syntetický přístup, kdy byl pro konjugaci zvolen chlorid kyseliny **6**. Tento prekurzor byl však naopak příliš reaktivní a docházelo ke vzniku jak požadovaného produktu **38**, tak bohužel také (a to v majoritním množství) bisderivátu **39**. Tyto produkty byly úspěšně odděleny preparativní chromatografií, nicméně výtěžek produktu **38** byl nižší než 10%.

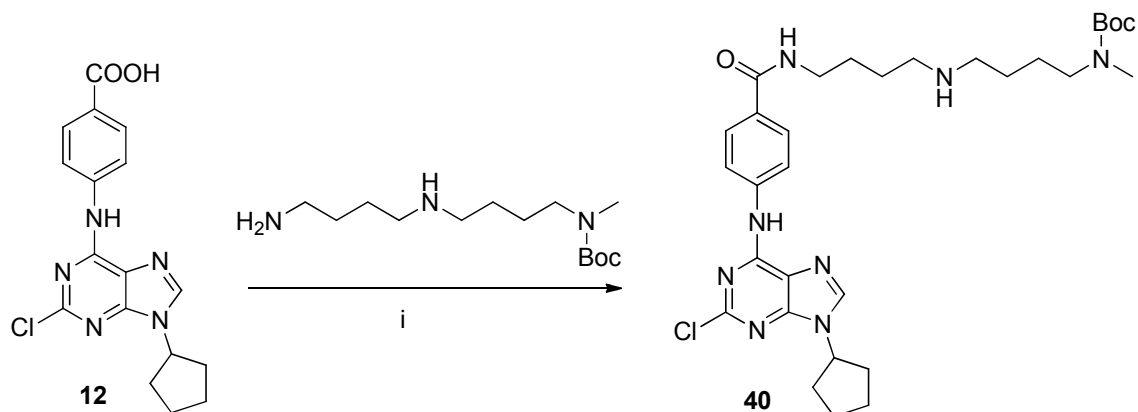


(i) *n*-propanol, 120 °C, 16 h



(i) *n*-propanol, 100 °C, 24 h, rt

Nejlépe se osvědčila metoda HATU couplingu, kdy byl získán požadovaný produkt ve vysokém výtěžku s poměrně vysokou čistotou. Derivát **40** je navržen pro univerzální syntetickou cestu s různými substitucemi v pozici C² purinového jádra.



(i) DIPEA, HATU, DMF, 50 °C, 24 h, i. atm

5. Experimentální část

5.1. Materiál a metody

V průběhu experimentální práce byla čistota produktů i meziproductů sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck). Vizualizace desek s nanášenými vzorky byla provedena pomocí UV lampy (Camag) o vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Čištění vybraných látek bylo provedeno pomocí preparativní tenkovrstevné chromatografie na TLC skleněných deskách pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA) nebo pomocí kolonové chromatografie.

Spektra nukleární magnetické rezonance (^1H NMR) byla získána na Bruker Avance AV 300 spektrometru při frekvenci 300 MHz. Další spektra (^1H NMR a ^{13}C NMR) byla měřena na spektrometru Jeol 500 při frekvenci 500 MHz a Jeol 400 při frekvenci 400 MHz. Látky byly rozpuštěny v DMSO- d_6 nebo v CDCl_3 . Hodnoty chemického posunu jsou udány v jednotkách ppm.

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru značky Waters (Q-TOF MICRO) s využitím pozitivní ionizace elektrosprejem. HPLC čistota připravených látek byla získána na koloně s reverzní fází (150 mm x 2,1 mm, 5 μm , Symmetry C18, Waters). Vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanášeny na kolonu a eluovány lineárním gradientem (methanol/15mM mravenčan amonný, pH = 4) při průtoku 0,25 ml/min. Detekce snímání kladných iontů probíhala ve full scan módu v rozmezí vlnových délek 50-1000 nm.

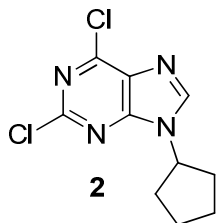
Analýza vybraných látek byla rovněž provedena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií na přístroji Shimadzu GC-MS QP 2010+ na koloně DB-5MS (Agilent, 30 m x 5 μm). Měření bylo provedeno pomocí elektronové ionizace (electron impact) +70 eV. Program byl následující: 60 °C, 15 °C/min, 280 °C (5 min). Analýza byla provedena v režimu splitless, kdy byl nástřik 1 μl vzorku o koncentraci 1mg/ml proveden při teplotě 280 °C.

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla jsou uvedeny v pracovních postupech experimentální části. 2,6-dichlorpurin byl jako jediný zakoupen od firmy OlChemim, rozpouštědla pak dále od firmy Lach-ner a všechny ostatní chemikálie od firmy Sigma Aldrich.

5.2. Syntéza prekurzorů

5.2.1. Prekurzory benzylaminového typu

2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin¹⁶⁹



K roztoku 2,6-dichlorpurinu (60,00 mmol) a cyklopentanolu (120,00 mmol) v THF (240 ml) byl pod dusíkovou atmosférou přidán trifenyfosfin (72,00 mmol) a po rozpuštění všech komponent byl v přítomnosti argonu opatrně přikapáván DIAD (72,00 mmol). V průběhu reakce byla udržována teplota reakční směsi v okolí 10 °C. Byla provedena kontrola TLC (mobilní fáze: ethylacetát:toluen, 1:1). Reakce probíhala po dobu 4 hodin. Po ukončení reakce byla směs vakuově odpařena a získaný žlutý odparek byl rozpuštěn ve 200 ml vroucího toluenu. Směs byla ochlazená na laboratorní teplotu, naočkována trifenyfosfinoxidem a ponechána do dalšího dne ke krystalizaci v mrazáku (-18 °C). Další den byl produkt zbaven pevné části (trifenyfosfinoxidu). Filtrát byl odpařen na RVO a rozpuštěn ve 150 ml vroucího etanolu. Poté byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, naočkována malým množstvím dříve nasyntetizované frakce 2,6-dichlor-9-cyklopentylpurinu a vložena ke krystalizaci do mrazáku. Další den byl produkt odsán na fritě a sušen ve vakuové sušárně do konstantní hmotnosti.

Výtěžek: 56%, t. t.: 118-120 °C

Sumární vzorec: C₁₀H₁₀Cl₂N₄

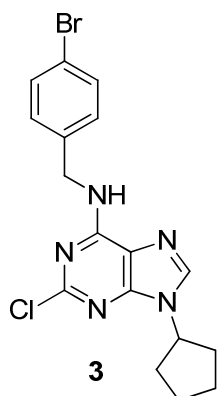
Mr = 257,12

Elementární analýza: Vypočteno: C, 46,71; H, 3,92; N, 21,79. Nalezeno: C, 46,95; H, 3,81; N, 21,70

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1,64-1,69(m, 2H); 1,81-1,96 (m, 4H); 2,09-2,15 (m, 2H); 4,92 (qui, J=7,53, 1H, CH); 8,82 (s, 1H, CH)

HPLC-MS (ESI+): 258,10 (99,6%)

***N*-(4-brombenzyl)-2-chlor-9-cyclopentyl-9*H*-purin-6-amin¹⁶⁹**



2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (9,52 mmol) byl míchán s (4-bromfenyl)methanamin hydrochloridem (10,47 mmol) a *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminem (21,04 mmol) v *n*-propanolu (50 ml) v tlakové ampuli při 120 °C po dobu 150 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena na RVO. Odparek byl suspendován ve 75 ml destilované vody. Vyloučená sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a promyta 75 ml destilované vody. Produkt byl vysušen v exikátoru.

Výtěžek: 97%

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇BrClN₅

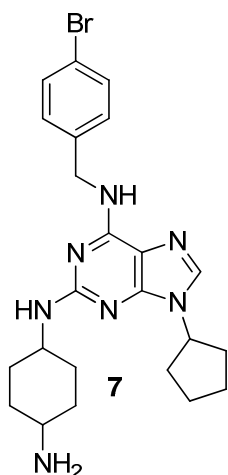
Mr = 406,71

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1,66-1,70 (m, 2H); 1,81-1,91 (m, 4H); 2,11-2,16 (m, 2H); 4,60 (d, J=5,76, 2H, CH₂); 4,77 (qui, J=7,05, 1H, CH), 7,29 (d, J=8,13, 2H, ArH); 7,50 (d, J=8,13, 2H, ArH); 8,26 (s, 1H, CH); 8,83(t, J=5,76, 1H, NH)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 23,97; 32,53; 43,08; 55,96; 119,02; 120,36; 130,05; 131,65; 139,31; 140,49; 150,34; 153,24; 155,33

HPLC-MS (ESI⁺): 407,97 (99,93%)

***N*²-(4-aminocyklohexyl)-*N*⁶-(4-brombenzyl)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2,6-diamin¹⁶⁹**



N-(4-Brombenzyl)-2-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (3,12 mmol) byl míchán s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem (62,44 mmol) v ethylenglykolu (6 ml) při teplotě 160 °C po dobu 18 hodin. Reakce byla provedena v tlakové ampuli. Reakční směs byla zředěna destilovanou vodou (50 ml) a následně byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x50 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a zakoncentrovány na RVO.

Výtěžek: 98%

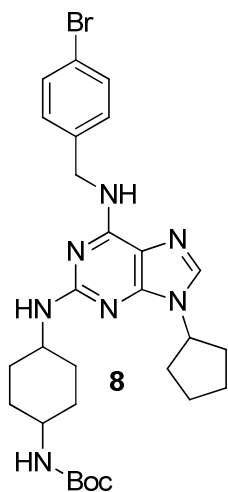
Sumární vzorec: C₂₃H₃₀BrN₇

Mr = 484,44

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 0,85-1,22 (m, 4H); 1,64-2,04 (m, 12H); 3,29-3,37 (m, 3H, CH,NH₂); 3,52 (sex, J=7,11, 1H, CH); 4,57 (s(br), 2H, CH₂); 4,62 (qui, J=7,38, 1H, CH); 6,02 (d, J=7,89, 1H, NH); 7,28 (d, J=8,31, 2H, ArH); 7,46 (d, J=8,31, 2H, ArH); 7,73 (s, 1H, CH); 7,84 (s (br), 1H, NH)

HPLC-MS (ESI⁺): 484,44 (99,89 %)

***Tert*-butyl ester kyseliny (4-((6-((4-brombenzyl)amino)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2-yl)amino)cyklohexyl)karbamové**



Ke směsi látky **7** (3,10 mmol) a NaHCO₃ (3,25 mmol) v THF (25 ml) a destilované vodě (2,5 ml) byl při teplotě 0 °C za stálého míchání přikapáván di-*tert*-butyl-dikarbonát (3,25 mmol). Směs se nechala dále míchat při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. Poté bylo provedeno TLC (chloroform-methanol-NH₄OH, 9:1:0,05). Reakční směs byla odpařena na RVO. Následně byl produkt rozdělen mezi DCM (3x 25 ml) a destilovanou vodu (1x 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodním roztokem NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

Výtěžek: 99%

Sumární vzorec: C₂₈H₃₈BrN₇O₂

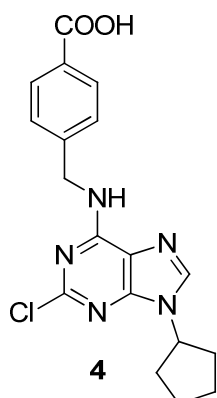
Mr = 584,55.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 1,06-1,20 (m, 5H); 1,33 (s, 9H); 1,59-1,99 (m, 12H); 3,54-3,55 (m, 1H, CH); 4,48 (s, 2H, CH₂); 4,57 (qui, J=6,50, 1H, CH); 6,03 (d, J=5,00, 1H, NH); 6,67 (d, J=5,00, 1H, NH); 7,23 (d, J=8,25, 2H, ArH); 7,43 (d, J=8,25, 2H, ArH); 7,69 (s, 1H, CH). *Pozn.*: NH nepozorován.

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 25,6; 28,81; 31,83; 32,27; 49,39; 49,81; 67,54; 77,78; 119,80; 129,98; 131,43; 140,87; 155,36; 158,79; 164,27

HPLC-MS (ESI⁺): 584,88 (98,64 %)

4-(((2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)benzoová kyselina



Látky 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (3,00 mmol), kyselina 4-(aminomethyl)benzoová (3,00 mmol) a DIPEA (6,00 mmol) byly míchány v *n*-propanolu (20 ml) v tlakové ampuli při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po kontrole TLC (Tol-dioxan-AcOH, 17:3:1) byla reakce ukončena. Reakční směs byla odpařena na RVO a odparek byl suspendován v destilované vodě (50 ml). Vyloučená sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a vysušena v exikátoru.

Výtěžek: 52%

Sumární vzorec: C₁₈H₁₈BrN₅O₂

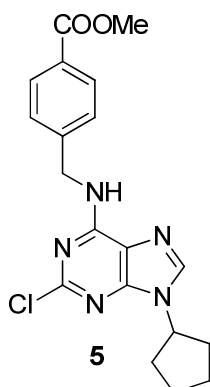
Mr = 371,82

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 1,58-1,68 (m, 2H, CH₂); 1,75-1,93 (m, 4H, 2xCH₂); 2,04-2,12 (m, 2H, CH₂); 4,73 (qui, J=7,00, 1H, CH); 7,17 (d, J=7,75, 2H, ArH); 7,75 (d, J=7,75, 2H, ArH); 8,21 (s, 1H, CH); 8,75 (t, J=6,00, 1H, NH) *Pozn.*: proton z COOH nepozorován.

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 26,08; 27,97; 32,54; 43,51; 55,95; 118,97; 126,54; 129,55; 139,62; 140,11; 140,37; 150,29; 153,31; 155,44; 170,20

HPLC-MS (ESI+): 371,92 (99,90 %)

Methyl ester kyseliny 4-(((2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)benzoové



Látky 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (5,83 mmol), methyl ester kyseliny 4-(aminomethyl)benzoové - hydrochlorid (5,83 mmol) a DIPEA (17,49 mmol) byly míchány v *n*-propanolu (25 ml) v tlakové ampuli při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Byla provedena kontrola TLC (chloroform-methanol, 40:1). Po ukončení reakce a ochlazení na laboratorní teplotu se v ampuli začal srážet produkt **5**. Vzniklá sraženina byla zfiltrována a promyta destilovanou vodou. Nakonec byl produkt vložen do sušárny (50 °C, 16 h) a exikátoru.

Výtěžek: 92 %

Sumární vzorec: C₁₉H₂₀ClN₅O₂

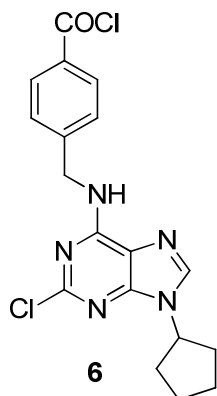
Mr = 385,85

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 1,54-1,68 (m, 2H, CH₂); 1,69-1,95 (m, 4H, 2xCH₂); 1,99-2,13 (m, 2H, CH₂); 3,74 (s, 3H, CH₃); 4,62 (d, J=5,25, 2H, CH₂); 4,70 (qui, J=7,50, 1H, CH); 7,37 (d, J=8,00, 2H, ArH); 7,82 (d, J=8,00, 2H, ArH); 8,20 (s, 1H, CH); 8,80 (t, J=5,25, 1H, NH)

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 23,78; 32,34; 43,27; 52,39; 55,78; 118,83; 127,68; 128,47; 129,59; 140,37; 145,34; 152,29; 152,94; 155,11; 166,42

HPLC-MS (ESI⁺): 385,84 (80,24%)

4-(((2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)benzoyl chlorid



Látka **4** (0,54 mmol) byla míchána s thionylchloridem (2,69 mmol) v 1,2-dichlorethanu (10 ml) v tlakové ampuli při teplotě 80 °C po dobu 4 hodin. Reakce byla katalyzována pyridinem (40 µl). Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena na RVO a odparek byl rozdělen mezi destilovanou vodu (1x15 ml) a DCM (3x15 ml). Spojené organické fáze byly následně promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

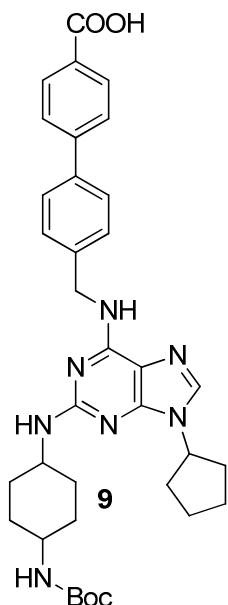
Výtěžek: 98 %

Sumární vzorec: C₁₈H₁₇Cl₂N₅O

Mr = 390,27

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,60-1,69 (m, 2H, CH₂); 1,74-1,98 (m, 4H, 2xCH₂); 2,01-2,19 (m, 2H, CH₂); 4,66 (d, J=5,60, 2H, CH₂); 4,75 (qui, J=8,00, 1H, CH); 7,40 (d, J=8,25, 2H, ArH); 7,85 (d, J=8,25, 2H, ArH); 8,30 (s, 1H, CH); 8,85 (t, J=7,00, 1H, NH)

4'-(((2-(((4-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)cyklohexyl)amino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)-[1,1'-bifeny]-4-karboxylová kyselina



Látka **8** (0,52 mmol), kyselina 4-karboxyfenylboronová (0,76 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0,02 mmol) a Na₂CO₃ (1,54 mmol) byly míchány v EtOH (10 ml) v tlakové ampuli při teplotě 80 °C po dobu 24 hodin. Reakce probíhala v inertní atmosféře (N₂). Reakce byla kontrolována pomocí TLC (toluen-dioxan-AcOH, 17:3:1). Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena na RVO a k odparku bylo přidáno 15 ml destilované vody. Následně byla provedena neutralizace definovaným množstvím 1M HCl (1,53 ml). Vzniklá sraženina byla zfiltrována a promyta destilovanou vodou. Nakonec byl produkt vložen do sušárny (50°C, 16 hodin).

Výtěžek: 96 %

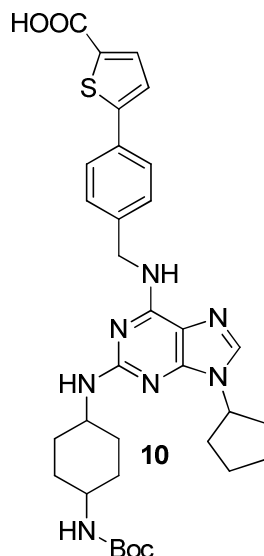
Sumární vzorec: C₃₅H₄₃N₇O₄

Mr = 625,76

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,19 (s, 9H); 1,54-1,74 (m, 6H); 1,77-1,95 (m, 9H, 3xCH₃); 2,07-2,42 (m, 4H); 4,59 (qui, J=6,85, 6H); 6,00 (d, J=7,60, 1H, NH); 6,67 (d, J=7,60, 1H, NH); 7,39 (d, J=8,42, 2H, ArH); 7,58 (d, J=7,25, 2H, ArH); 7,60 (d, J=7,25, 2H, ArH); 7,72 (s, 1H, CH); 7,91 (d, J=8,42, 2H, ArH). Pozn.: proton z COOH nepozorován.

HPLC-MS (ESI+): 627,14 (85,11%)

5-(4-(((2-((4-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)cyklohexyl)amino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)fenyl)thiofen-2-karboxylová kyselina



Látka **8** (0,29 mmol), pinacol ester kyseliny 5-karboxythiofen-2-boronové (0,44 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0,01) a NaHCO₃ (0,87 mmol) byly míchány ve směsi EtOH/H₂O (7,5/2,5 ml) v tlakové ampuli při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Reakce probíhala v inertní atmosféře (N₂). Reakce byla kontrolována pomocí TLC (toluen-dioxan-AcOH, 17:3:1). Po ukončení reakce bylo přidáno 15 ml destilované vody a byla provedena neutralizace 20 µl CH₃COOH. Vzniklá sraženina byla zfiltrována a promyta destilovanou vodou. Nakonec byl produkt vložen do sušárny (50°C, 16 hodin). Produkt byl přečištěn kolonovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: směs chloroform-methanol, 4:1).

Výtěžek: 67%

Sumární vzorec: C₃₃H₄₁N₇O₄S

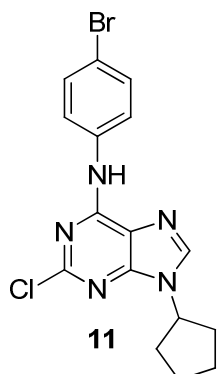
Mr = 631,79

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,07-1,22 (m, 6H); 1,33 (s, 9H, 3xCH₃); 1,52-1,64 (m, 2H); 1,65-1,75 (m, 2H); 1,76-1,92 (m, 4H); 1,95-2,07 (m, 2H); 3,43 (sex, J=6,39, 1H, CH); 4,43 (sex, J=5,29, 1H, CH); 4,52-4,63 (m, 3H, CH, CH₂); 5,99 (d, J=7,60, 1H, NH); 6,65 (d, J=8,00, 1H, NH); 7,36 (d, J=8,00, 2H, ArH); 7,44 (d, J=3,2, 1H, ArH); 7,59-7,64 (m, 3H, ArH); 7,70 (s, 1H, CH). *Pozn.*: Proton z COOH nepozorován.

HPLC-MS (ESI+): 632,78 (85,23%)

5.2.2. Prekurzory anilinového typu

N-(4-bromfenyl)-2-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin



2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (7,78 mmol) byl míchán s 4-bromanilinem (8,56 mmol) a DIPEA (17,12 mmol) v *n*-propanolu (25 ml) v tlakové ampuli při 100 °C po dobu 13 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs odpařena na RVO a odparek byl rozpuštěn v 50 ml DCM a extrahován 50 ml H₂O. Vodná fáze byla ještě jednou protřepána s 50 ml DCM. Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny MgSO₄ a vakuově odpařeny. Surový produkt byl rekrystalizován ze 35 ml EtOH a následně byl ponechán chlazení při teplotě -15 °C po dobu 2 hodin a následně zfiltrován, promyt 2x 5ml EtOH (0 °C). Nakonec byl produkt vložen do sušárny (80 °C, 2 h).

Výtěžek: 75%

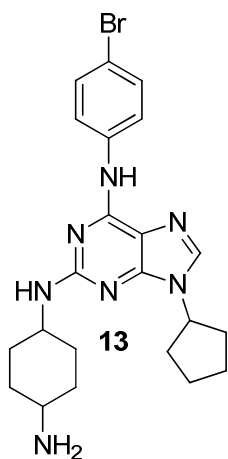
Sumární vzorec: C₁₆H₁₅BrClN₅

Mr = 392,68

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1,69-1,76 (m, 2H, 2xCH₂); 1,85-2,04 (m, 4H, 2xCH₂); 2,23-2,15 (m, 2H, CH₂); 4,85 (qui, J=7,41, 1H, CH); 7,53 (d, J=8,73, 2H, ArH); 7,83 (d, J=8,73, 2H, ArH); 8,45 (s, 1H, CH); 10,42 (s, 1H, NH)

HPLC-MS (ESI+): 99,91 % (393,70)

***N*²-(4-aminocyklohexyl)-*N*⁶-(4-bromfenyl)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2,6-diamin**



Látka **11** (5,00 mmol) byla míchána s *trans*-1,4-diaminocyklohexanem (100,00 mmol) v tlakové ampuli při 160 °C po dobu 7 hodin. Reakce probíhala v inertní atmosféře (Ar). Průběh reakce byl kontrolován TLC (CHCl₃-MeOH, 4:1). Po ochlazení na 100 °C byla reakční směs zředěna destilovanou vodou (80 ml). Následně byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x80 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým MgSO₄ a vakuově odpařeny.

Výtěžek: 97%

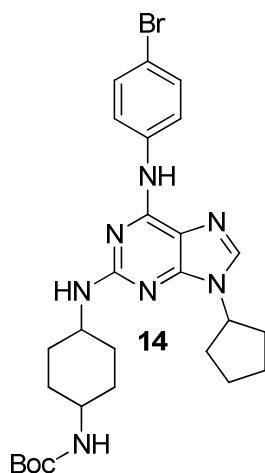
Sumární vzorec: C₂₂H₂₈BrN₇

Mr = 470,41

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 1,08-1,32 (m, 4H, 2xCH₂); 1,65-1,69 (m, 2H, CH₂); 1,78-2,08 (m, 12H, 5xCH₂, NH₂); 2,55 (sept, J=3,93, 1H, CH); 3,58-3,62 (m, 1H, CH); 4,69 (qui, J=7,59, 1H, CH); 6,50 (d, J=7,41, 1H, NH); 7,42 (d, J=8,85, 2H, ArH); 7,90 (s, 1H, CH); 8,05 (d, J=8,85, 2H, ArH); 9,58 (s, 1H, NH)

HPLC-MS (ESI⁺): 470, 13 (94,57%)

***Terc*-butyl(4-((6-((4-bromfenyl)amino)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2-yl)amino)cyklohexyl)karbamát**



Látka **13** (1,59 mmol) a NaHCO₃ (1,67 mmol) byly rozpuštěny v THF (15 ml). Poté byl při teplotě 0 °C za stálého míchání přikapáván di-*terc*-butyl-dikarbonát (1,67 mmol). Směs se nechala dále míchat při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté bylo provedeno TLC (chloroform-methanol-NH₄OH, 9:1:0,05). Reakční směs byla odpařena na RVO. Následně byl produkt rozdělen mezi DCM (3x 25 ml) a destilovanou vodu (1x 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

Výtěžek: 84%

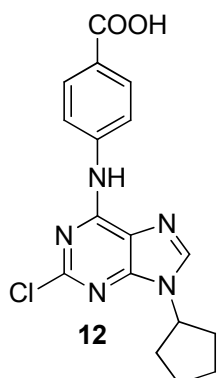
Sumární vzorec: C₂₇H₃₆BrN₇O₂

Mr = 570,52

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,21-1,37 (m, 6H, 3xCH₂); 1,45 (s, 9H); 1,71-2,12 (m, 6H, 3xCH₂); 2,16-2,26 (m, 4H, 2xCH₂); 3,48 (s, 1H, CH); 3,70-3,79 (m, 1H, CH); 4,44 (d, J=5,60, 1H, NH); 4,72 (qui, J=7,25; 1H, CH); 4,86 (d, J=6,43, 1H, NH); 7,40 (d, J=8,75, 2H, ArH); 7,56 (s, 1H, CH); 7,68 (d, J=8,75, 2H, ArH); 7,74 (s, 1H, NH)

HPLC-MS (ESI⁺): 571,49 (99,12%)

4-((2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)benzoová kyselina



Látky 2,6-dichlor-9-cyklopentyl-9H-purin (3,88 mmol), kyselina 4-aminobenzoová (3,88 mmol) a DIPEA (11,44 mmol) byly míchány v *n*-propanolu (15 ml) v tlakové ampuli při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po kontrole TLC (Tol-dioxan-AcOH, 17:3:1) byla reakce ukončena. Reakční směs byla odpařena na RVO a odparek byl suspendován v destilované vodě (50 ml). Vyloučená sraženina byla odsáta na fritě nálevce a vysušena v exikátoru.

Výtežek: 95%

Sumární vzorec: C₁₇H₁₆ClN₅O₂

Mr = 357,79

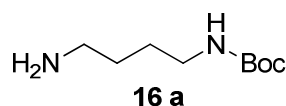
HPLC-MS (ESI+): 358,62 (95,99%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 1,60-1,71 (m, 2H, CH₂); 1,67-1,87 (m, 2H, CH₂); 1,89-1,98 (m, 2H, 2CH₂); 2,09-2,18 (m, 2H, 2CH₂); 4,80 (qui, J=7,50 1H, CH); 7,86 (d, J=9,00, 2H, ArH); 7,95 (d, J=9,00, 2H, ArH); 8,42 (s, 1H, CH); 10,55 (s, 1H, NH).

Pozn.: proton z COOH nepozorován.

5.2.3. Polyaminové prekurzory

Terc-butyl(4-aminobutyl)karbamát¹⁷⁰



K roztoku 1,4-diaminobutanu (11,34 mmol) v CHCl₃ byl během 30 minut za chlazení (0-5 °C) přikapán Boc₂O (0,10 mmol). Reakční směs byla dále míchána za laboratorní teploty přes noc. Bylo provedeno TLC (CHCl₃-MeOH, 2:1). Po ukončení reakce byla

reakční směs zředěna destilovanou vodou (50 ml) a dále byla provedena extrakce do chloroformu (3x50 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

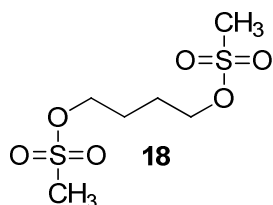
Výtěžek: 9 %

Sumární vzorec: C₉H₂₀N₂O₂

Mr = 188,15

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 1,17 (s (br), 2H, NH₂); 1,39-1,54 (m, 13H, 2xCH₂, 3xCH₃); 2,69 (t, J=7,00, 2H, CH₂); 3,11 (t, J=6,5, 2H, CH₂), 4,65 (s (br), 1H, NH)

butan-1,4-diyl dimethansulfonát



K roztoku 1,4-butandiolu (100,00 mmol) a methansulfonylchloridu (205,00 mmol) v suchém THF (250 ml) byl za stálého míchání přikapáván triethylamin takovou rychlostí, aby teplota reakční směsi nepřekročila 0 °C. Dále byl roztok míchán při teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla směs ponechána za míchání při laboratorní teplotě po dobu 16 hodin. Vzniklá pevná fáze (produkt s triethylamonium chloridem) byla zfiltrována a promyta malým množstvím THF. Pevný produkt byl rozmíchán v 250 ml destilované vody. Suspenze byla extrahována 2x 150 ml DCM. Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

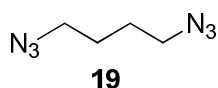
Výtěžek: 92%

Sumární vzorec: C₉H₁₄O₆S₂

Mr = 246,30

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 4,24 (t, J=3,30, 4H, 2xCH₂); 3,18 (s, 6H, 2xCH₃); 1,76 (qui, J=3,45, 4H, 2xCH₂)

1,4-diazidobutan



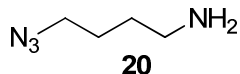
Látka **18** (25,00 mmol) a azid sodný (60,00 mmol) byly míchány v DMF (40 ml) při teplotě 80 °C po dobu 14 hodin. Reakce probíhala v tlakové ampuli v inertní atmosféře (N₂). Byla provedena kontrola TLC (hexan-ethylacetát, 9:1 a 4:1). Reakční směs byla zfiltrována (odstranění MeSO₂Na) a odpařena na RVO. Odparek byl následně rozdělen mezi destilovanou vodu (100 ml) a DCM (100 ml). Vodná fáze byla ještě jednou extrahována do DCM (50 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

Výtěžek: 95%

Sumární vzorec: C₄H₈N₆

Mr = 140,15

4-azidobutan-1-amin



K roztoku látky **19** (20,81 mmol) v 75 ml Et₂O bylo přidáno 120 ml HCl a za intenzivního míchání byl přikapáván roztok trifenylfosfinu (21,85 mmol) v 75 ml diethyletheru. Průběh reakce byl kontrolován TLC (petrolether-ethylacetát, 1:1). Po 4 hodinách byla reakce ukončena. Vodná fáze byla oddělena od organické fáze a následně byla vytřepána do diethyletheru (1x 50 ml). Vodná fáze byla dále alkalizována 4M NaOH na pH ~ 10-12. Po neutralizaci byla provedena extrakce do DCM (3x50 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

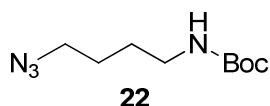
Výtěžek: 65%

Sumární vzorec: C₄H₁₀N₄

Mr = 114,09

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1,37 (qui, J=3,75, 2H, CH₂); 1,55 (qui, J=3,48, 2H, CH₂); 1,77 (s (br), 2H, NH₂); 2,53 (t, J=6,81, 2H, CH₂); 3,31(t, 6,90, 2H, CH₂)

Tert-butyl (4-azidobutyl)karbamát



K roztoku látky **20** (10,00 mmol) v THF byl během 30 minut za chlazení (0-5 °C) přikapán Boc₂O (10,50 mmol). Reakční směs byla dále míchána za laboratorní teploty přes noc. Reakční směs byla odpařena, k odparku byla přidána destilovaná voda (15 ml) a dále byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x25 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

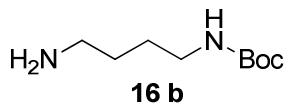
Výtěžek: 95%

Sumární vzorec: C₉H₁₈N₄O₂

Mr = 214,26

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 1,37 (s, 9H, 3x CH₃); 1,43 (qui, J=6,93, 2H, CH₂); 2,91 (q, J=6,18, 2H, CH₂); 3,29-3,35 (m, 4H, CH₂). Pozn.: proton z NH nepozorován.

Terc-butyl(4-aminobutyl)karbamát



Látka **22** byla redukována pomocí H₂ na Pd-C 5% (1 mol%) v methanolu (50 ml) za laboratorní teploty a atmosferického tlaku. Po dvou hodinách byla reakce ukončena. Následně byla provedena filtrace a směs byla odpařena na RVO.

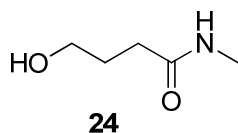
Výtěžek: 98%

Sumární vzorec: C₉H₂₀N₂O₂

Mr = 188,15

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 1,17 (s (br), 2H, NH₂); 1,39-1,54 (m, 13H, 2xCH₂, 3xCH₃); 2,69 (t, J=7,00, 2H, CH₂); 3,11 (q, J=6,5, 2H, CH₂), 4,65 (s (br), 1H, NH)

4-hydroxy-*N*-methylbutanamid¹⁷¹



40% Vodný roztok methylaminu (1,86 mol) byl ochlazen na teplotu 0 °C a k tomuto roztoku byl za stálého míchání a chlazení přikapáván γ -butyrolakton (0,62 mol). Po ukončení přidávání byl roztok dále míchán při teplotě 0-5 °C po dobu 2 hodin. Reakční směs byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve 200 ml THF a vysušen přidávkem bezvodého síranu sodného (25 g). Následně byla směs zfiltrována a odpařena na RVO, k odparku byl přidán toluen (150 ml) a směs byla znovu odpařena na RVO.

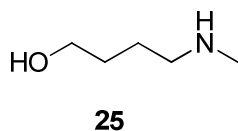
Výtěžek: 98%

Sumární vzorec: C₅H₁₁NO₂

Mr = 117,15

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,61 (qui, J=7,01, 2H, CH₂); 2,07 (t, J=7,54, 2H, CH₂); 2,53 (s, 3H, CH₃); 3,34(q, J=6,32, 2H, CH₂); 4,44 (t, J=5,16, 1H, OH); 7,67 (s (br), 1H, NH)

4-(methylamino)butan-1-ol¹⁷²



K roztoku LiAlH₄ (210,00 mmol) v THF (120 ml) byl při teplotě 0-5 °C v inertní atmosféře (N₂) přikapáván roztok **24** v THF (80 ml) takovou rychlostí, aby teplota nepřekročila 5 °C. Poté byla reakční směs refluxována bez přístupu vzdušné vlhkosti po dobu 2 hodin. Po ochlazení na teplotu 0-5 °C byl za stálého míchání a chlazení přikapáván 15% vodný roztok NaOH (30 ml). Poté byla reakční směs míchána za laboratorní teploty po dobu 2 hodin. Následně byl pevný podíl zfiltrován, promyt THF (3x25 ml) a filtrát byl odpařen na RVO. Szrový produkt byl čištěn vakuovou destilací (50 °C/5-10 mbar).

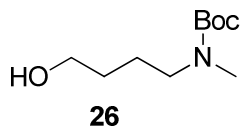
Výtěžek: 75%

Sumární vzorec: C₅H₁₃NO

Mr = 103,16

^1H NMR (300 MHz CDCl_3): 1,50–1,75 (m, 5H, $2\times\text{CH}_2$, OH); 2,43 (s, 3H, CH_3); 2,62 (t, $J=5,70$, 2H, CH_2); 3,45 (s(br), 1H, NH); 3,57 (t, $J=5,40$, 2H, CH_2)

***Terc*-butyl (4-hydroxybutyl)(methyl)karbamát¹⁷²**



Látka **25** (58,45 mmol) byla převedena do roztoku s triethylaminem (60,00 mmol) a methanolem (55 ml) a tato směs byla míchána 10 minut při teplotě 0 °C. Během dalších 10 minut byl po kapkách přidán roztok di-*tert*-butyl dikarbonátu (72,00 mmol) v methanolu (35 ml). Směs byla míchána v atmosféře dusíku po dobu 1 hodiny. Poté byla reakční směs míchána za laboratorní teploty přes noc. Roztok byl vakuově odpařen, rozpuštěn v DCM a promyt destilovanou vodou. Organická fáze byla oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným a zakoncentrována na RVO. Byl získán olejovitý produkt.

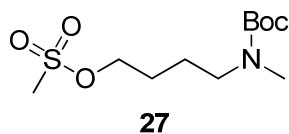
Výtěžek: 75%

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}_3$

Mr = 203,28

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 1,53 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$); 1,53-1,59 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 2,84 (s, 3H, CH_3); 3,25 (t, $J=4,50$, 2H, CH_2); 3,67-3,72 (q, $J=4,92$, 2H, CH_2)

4-((*tert*-butoxykarbonyl)(methyl)amino)butyl methansulfonát¹⁷²



K roztoku látky **26** (29,50 mmol) a triethylaminu (153,00 mmol) v DCM (85 ml) byl při teplotě 0 °C v tříhrdlé baňce v inertní atmosféře přikapáván mesylchlorid (188,31 mmol). Reakční směs byla míchána při teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny. Po vystoupení na laboratorní teplotu byl roztok ponechán míchání přes noc. Reakční směs byla znovu ochlazená na 0 °C a poté byl za stálého míchání přidán 1M NaOH (710 ml). Organická fáze byla oddělena a vytřepána v destilované vodě (350 ml). Následně byla ještě jednou vytřepána, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena na RVO.

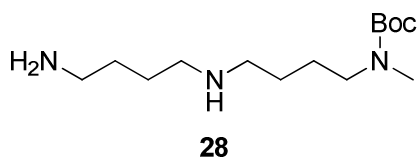
Výtěžek: 80%

Sumární vzorec: C₁₁H₂₃NO₅S

Mr = 281,37

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): ¹H NMR (CDCl₃): 1,45 (s, 9H, 3xCH₃); 1,59-1,79 (m, 4H, 2xCH₂); 2,84 (s, 3H, CH₃); 3,01 (s, 3H, CH₃); 3,26 (t, J=6,75, 2H, CH₂); 4,26(t, J=6,03, 2H, CH₂)

***Terc*-butyl (4-((4-aminobutyl)amino)butyl)(methyl)karbamát¹⁷²**



Směs putrescinu v AcCN (20 ml) a K₂CO₃ (46,00 mmol) byla za laboratorní teploty míchána v atmosféře dusíku. Látka **27** (9,24 mmol) byla rozpuštěna v AcCN (6 ml) a během 30 minut byl tento roztok přidáván do uvedené směsi putrescinu a K₂CO₃ v AcCN. Reakční směs byla převedena do tlakové ampule a byla ponechána míchaní při teplotě 95 °C přes noc. K₂CO₃ byl zfiltrován, k reakční směsi byl přidán DCM (85 ml) a poté byla provedena extrakce do (6x50 ml) nasyceného vodného roztoku uhličitanu sodného. Organická fáze byla promyta destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena na RVO.

Výtěžek: 80%

Sumární vzorec: C₁₄H₃₁N₃O₂

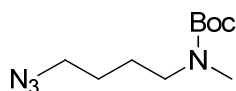
Mr = 273,41

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,43 (s, 9H, 3xCH₃); 1,47-1,59 (m, 12H, 6xCH₂); 2,59-2,62 (m, 3H, NH, CH₂); 2,81 (s, 3H, CH₃); 3,18 (t, J=6,00, 2H, CH₂)

¹³C NMR (400MHz, CDCl₃): 27,24; 27,56; 28,55; 31,63; 34,17; 42,16; 49,68; 49,86; 79,24; 155,89

GC-MS: m/z (rel.int.): 84,15 (100); 57,10 (52); 70,10 (41); 72,10 (28); 101,15 (27); 86,10 (15). R_t = 12,82.

***Terc*-butyl (4-azidobutyl)(methyl)karbamát**



29

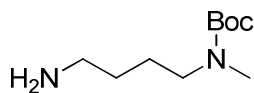
Látka **27** (10,70 mmol) a azid sodný (25,68 mmol) byly přes noc míchány v tlakové ampuli v atmosféře dusíku při teplotě 80 °C. Vyloučená sraženina MeSO₂Na byla odsáta na fritě, promyta DMF a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozdělen mezi destilovanou vodu (20 ml) a Et₂O (20 ml) vodná fáze byla ještě jednou vytřepána 20 ml Et₂O. Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou (20 ml), nasyceným vodným roztokem NaCl (40 ml) a vysušeny bezvodým síranem sodným. Nakonec byla organická fáze odpařena na RVO.

Výtěžek: 99%

Sumární vzorec: C₁₀H₂₀N₄O₂

Mr = 228,29

***Terc*-butyl (4-aminobutyl)(methyl)karbamát**



30

K roztoku látky **29** (10,64 mmol) ve 25 ml Et₂O bylo přidáno 15 ml destilované vody a za intenzivního míchání byl ke směsi přikapáván roztok PPh₃ (11,17 mmol) ve 25 ml Et₂O. Směs byla míchána v inertní atmosféře dusíku přes noc. Reakční směs byla okyselena CH₃COOH (3 ml). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla vytřepána 2x 20 ml Et₂O. Vodná fáze byla následně alkalizována nasyceným vodným roztokem Na₂CO₃ (15 ml). Poté byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na RVO.

Výtěžek: 35%

Sumární vzorec: C₁₀H₂₂N₂O₂

Mr = 202,29

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1,43 (s, 9H, 3x CH_3); 1,49-1,56 (m, 2H, CH_2); 1,87 (s (br), 2H, NH_2); 2,70 (t, $J=6,80$, 2H, CH_2); 2,81 (s, 3H, CH_3); 3,19 (m, 4H, 2x CH_2)

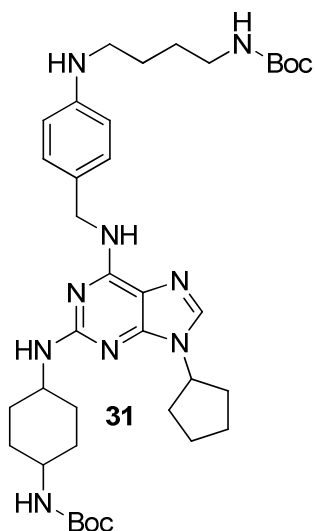
^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): 25,12; 28,54; 30,59; 34,17; 41,88; 48,54; 79,26; 155,90

GC-MS: m/z (rel.int.): 57,10 (100); 70,05 (29); 59,05 (23); 84,10 (23); 88,05 (19); 72,10 (14). $R_t = 7,68$.

5.3. Syntéza konjugátů

5.3.1. Konjugáty typu sekundárních aminů

***Terc*-butyl ester(4-{6-[4-(4-*terc*-butoxykarbonylamino-butylamino)-benzylamino]-9-cyklopentyl-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexyl)-karbamové**



Látky **8** (0,17 mmol) a **16a** (0,20 mmol), rac-BINAP (0,014 mmol), *t*-BuOK (0,26 mmol), $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (0,007 mmol) byly mícháány v suchém toluenu (5 ml) v tlakové ampuli při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Tato reakce probíhala v atmosféře argonu. Reakce byla kontrolována TLC (petrolether-ethylacetát, 3:1). Reakční směs byla zředěna vodou (15 ml) a extrahována do toluenu (3x15 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

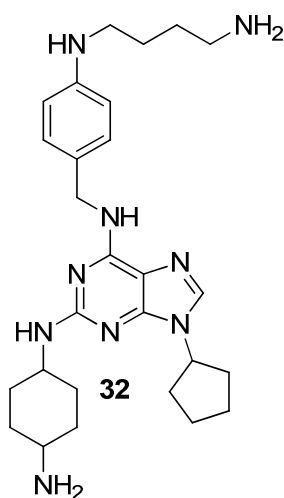
Výtěžek: 93%

Sumární vzorec: C₃₇H₅₇N₉O₄

Mr = 691,45

HPLC-MS (ESI⁺): 691,81 (94,31%)

***N*⁶-(4-((4-aminobutyl)amino)benzyl)-*N*²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2,6-diamin**



Látka **31** (0,15 mmol) byla rozpuštěna v suchém DCM (3 ml). Tento roztok byl ochlazen na teplotu 0 °C a následně za stálého míchání byla přidána TFA (1,5 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě 0-5 °C po dobu dvou hodin. Reakce byla kontrolována TLC (petrolether-ethylacetát, 1:1, 3:1). Reakční směs byla odpařena na RVO, odparek byl ještě 3krát prodestilován s DCM (5 ml). Poté bylo k odparku přidáno 10 ml destilované vody a byla provedena neutralizace 5% NaHCO₃ za stálé kontroly pH. Následně byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x15 ml) a spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny. Produkt byl čištěn kolonovou chromatografií v mobilní fázi CHCl₃-MeOH-NH₄OH, 4:1:0,05.

Výtěžek: 24%

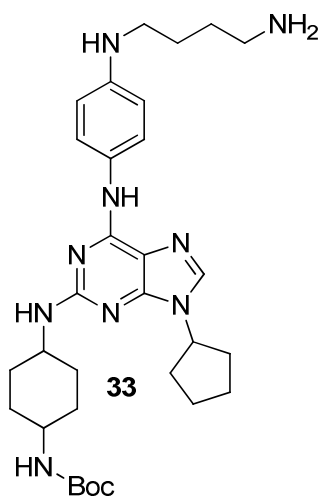
Sumární vzorec: C₂₇H₄₁N₉

Mr = 491,67

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 1,67-1,80 (m, 2H); 1,82-1,96 (m, 5H); 1,98-2,23 (m, 8H); 2,95-3,03 (m, 1H, CH); 3,70-3,80 (m, 1H, CH); 4,61 (d, $J=8,00$, 1H, NH); 4,67-4,74 (m, 3H, CH, CH_2); 6,07 (s (br), 1H, NH); 7,21 (d, $J=8,80$, 2H, ArH); 7,41 (d, $J=8,80$, 2H, ArH); 7,47 (s, CH, 1H)

HPLC-MS (ESI⁺): 492,54 (95,70%)

***Terc*-butyl(4-((6-((4-((4-aminobutyl)amino)fenyl)amino)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2-yl)amino)cyklohexyl)karbamát**



Látka **14** (0,35 mmol), putrescin (0,40 mmol), rac-BINAP (0,028 mmol), *t*-BuOK (0,53 mmol), $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (0,014 mmol) byly míchány v suchém toluenu (5 ml) v tlakové ampuli při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Tato reakce probíhala v atmosféře argonu. Reakce byla kontrolována TLC (petrolether-ethylacetát, 1:1). Reakční směs byla zředěna destilovanou vodou (15 ml) a extrahována do toluenu (3x15 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

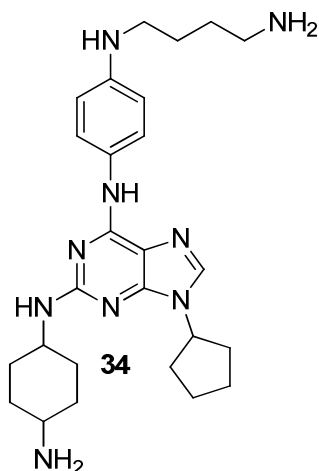
Výtěžek: 97%

Sumární vzorec: $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{N}_9\text{O}_2$

Mr = 577,76

HPLC-MS (ESI⁺): 578,80 (93,87%)

***N*⁶-(4-((4-aminobutyl)amino)fenyl)-*N*²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-2,6-diamin**



Látka **33** (0,23 mmol) byla rozpuštěna v suchém DCM (3 ml). Tento roztok byl ochlazen na teplotu 0 °C a následně za stálého míchání byla přidána TFA (1,5 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě 0-5 °C po dobu dvou hodin. Reakce byla kontrolována TLC (petrolether-ethylacetát, 1:1). Reakční směs byla odpařena na RVO, odparek byl ještě 3krát prodestilován s DCM (5 ml). Poté bylo k odparku přidáno 10 ml destilované vody a byla provedena neutralizace 5% NaHCO₃ za stálé kontroly pH. Následně byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x15 ml) a spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

Výtěžek: 97%

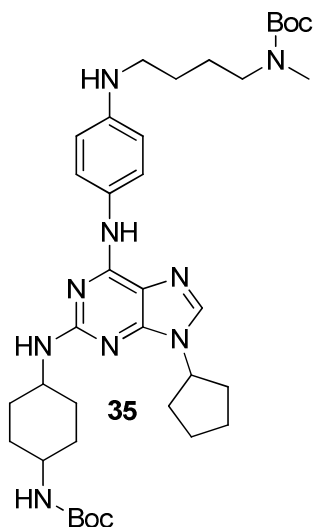
Sumární vzorec: C₂₆H₃₉N₉

Mr = 477,65

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,18-1,34 (m, 3H); 1,48-1,63 (m, 2H); 1,68-1,80 (m, 2H); 1,83-2,03 (m, 4H); 2,07-2,31 (m, 6H); 2,96-3,08 (m, 1H, CH); 3,77-3,89 (m, 1H, CH); 4,72 (qui, J=7,20, CH); 4,76 (d, J=7,60, 1H, NH); 7,25 (s, 1H, NH); 7,41 (d, J=8,80, 2H, ArH); 7,55 (s, 1H, CH); 7,66 (d, J=8,80, 2H, ArH)

HPLC-MS (ESI⁺): 478,55 (94,34%)

***Terc*-butyl(4-((4-((2-((4-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)cyklohexyl)amino)-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-yl)amino)fenyl)amino)butyl)(methyl)karbamát**



Látka **14** (0,11 mmol), látka **30** (0,13 mmol), BrettPhos PdG1, Me-*t*-Bu Adduct (0,005 mmol), *t*-BuONa (0,13 mmol), byly mícháány v suchém THF (4 ml) v tlakové ampuli při teplotě 100 °C po dobu 24 hodin. Tato reakce probíhala v atmosféře dusíku. Reakce byla kontrolována TLC (toluen-ethylacetát, 1:1). Reakční směs byla odpařena na RVO a získaný odparek byl zředěn destilovanou vodou (15 ml) a extrahován do toluenu (3x15 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

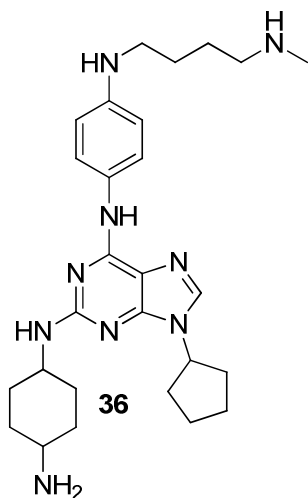
Výtěžek: 73%

Sumární vzorec: C₃₇H₅₇N₉O₄

Mr = 691,91

HPLC-MS (ESI⁺): 693,11 (87,23%)

***N*²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklopentyl-*N*⁶-(4-((4-(methylamino)butyl)amino)fenyl)-9*H*-purin-2,6-diamin**



Látka **35** (0,08 mmol) byla rozpuštěna v suchém DCM (4 ml). Tento roztok byl ochlazen na teplotu 0 °C a následně za stálého míchání byla přidána TFA (1 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě 0-5 °C po dobu dvou hodin. Reakční směs byla odpařena na RVO, odparek byl ještě 3krát prodestilován s DCM (5 ml). Poté bylo k odparku přidáno 10 ml destilované vody a byla provedena neutralizace 5% NaHCO₃ za stálé kontroly pH. Následně byla provedena extrakce do ethylacetátu (3x15 ml) a spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

Výtěžek: 66%

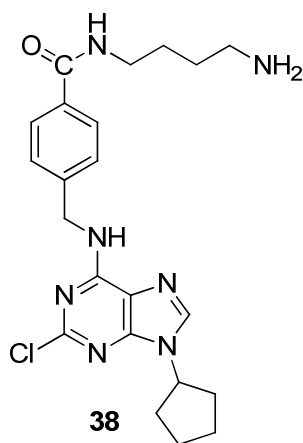
Sumární vzorec: C₂₇H₄₁N₉

Mr = 491,67

HPLC-MS (ESI⁺): 492,64 (87,47%)

5.3.2. Konjugáty typu amidů

N-(4-aminobutyl)-4-(((2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)amino)methyl)benzamid



Látka **6** (0,26 mmol) byla míchána s putrescinem (0,77 mmol) v *n*-propanolu (10 ml) v tlakové ampuli při teplotě 100 °C. Reakce probíhala v atmosféře dusíku po dobu 24 hodin. Kontrola TLC byla provedena v mobilní fázi chloroform-methanol, 4:1. Reakční směs byla odpařena na RVO, zředěna destilovanou vodou (15 ml) a extrahována do ethylacetátu (3x15 ml). Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny. Produkt byl dále čištěn preparativní TLC v mobilní fázi CHCl₃-MeOH-NH₄OH, 4:1:0,05.

Výtěžek: 6%

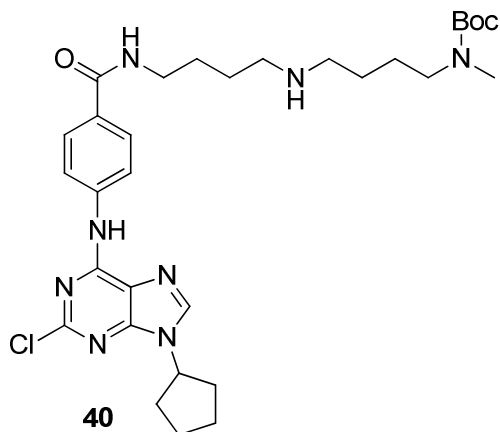
Sumární vzorec: C₂₂H₂₈ClN₇O

Mr = 441,96

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 0,44-0,57 (m, 2H); 0,65-0,73 (m, 2H); 0,80-1,01 (m, 4H); 1,08-1,20 (m, 2H); 1,45-1,53 (m, 6H); 1,80 (s (br), 2H, NH₂); 3,68 (d, J=5,20, 2H, CH₂); 3,78 (qui, 1H, CH); 6,39 (d, J=8,00, 2H, ArH); 6,78 (d, J=8,00, 2H, ArH); 7,19 (s, 1H, CH); 7,47 (t, J= 4,32, 1H, NH); 7,78(t, J=4,80, 1H, NH)

HPLC-MS (ESI+): 442,43 (99,91 %)

***Tert*-butyl(4-((4-(4-((2-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-yl)amino)benzamido)butyl)amino)butyl)(methyl)karbamát**



Látka **14** (0,28 mmol) byla míchána s polyaminem **28** (0,34 mmol) v prostředí suchého DMF (5 ml) v tlakové ampuli po dobu 24 hod. Reakce probíhala v atmosféře dusíku při teplotě 50 °C. Reakční směs byl odpařena na RVO. Odparek byl zředěn vodou (15 ml) a extrahován 3x15 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty destilovanou vodou, nasyceným vodným roztokem NaCl a vysušeny bezvodým síranem sodným.

Výtěžek: 99%

Sumární vzorec: C₃₁H₄₅ClN₈O₃

Mr = 613,19

HPLC-MS (ESI⁺): 613,86 (95%)

6. Závěr

Cílem práce byla příprava 2-aminocykloalkyl-6-aryl(biaryl)amino-9-cykloalkyl-9*H*-purinových derivátů s polyaminy. Byly připraveny 4 cílové monoarylové prekurzory (**4,5,6,8**) a 2 biarylové prekurzory (**9,10**) benzylaminového typu. Další úspěšně připravené monoarylové prekurzory jsou látky anilinového typu (**12,14**).

Dále byl připraven putrescin chráněný skupinou Boc (**16a, 16b**) a také methylovaný putrescin (**30**). Mimo jiné se také zdárně podařilo připravit symetrický methylovaný polyamin (**28**).

Nakonec byly připraveny 3 cílové konjugáty typu sekundárních aminů **32,34** a **36** a konjugáty typu amidů **38** a **40**. Derivát **40** je navržen pro univerzální syntetickou cestu s různými substitucemi v pozici C² purinového jádra. Pro přípravu konjugátů typu amidů se nejlépe osvědčila metoda HATU couplingu, kdy byl získán produkt ve vysokém výtěžku s poměrně vysokou čistotou. Syntéza konjugátů typu sekundárních aminů a jejich následná charakterizace byla poměrně náročná. Pro přípravu těchto látek byl zvolen přístup Buchwald-Hartwigovy aminace za použití různých Pd katalyzátorů a reakčních podmínek. Jako ligand byl zvolen rac-BINAP. Nicméně tyto podmínky byly vhodné pouze pro konjugáty, jež zahrnovaly Boc-chráněný putrescin či putrescin samotný. Konjugáty typu sekundárních aminů obsahující methylovaný polyamin se touto metodou nezdařilo připravit. Proto byl zvolen BrettPhos Pd-prekatalyzátor. Tímto přístupem již bylo dosaženo požadovaného produktu, nicméně je stále nutno optimalizovat podmínky pro jeho čištění a izolaci.

Cílem budoucí práce je optimalizace reakčních podmínek, příprava nové řady polyaminových konjugátů a studium biologické aktivity.

7. Seznam zkratek

ADDP	1,1'-(azodikarbonyl)dipiperidin
AdoMet	S-adenosylmethionin
AdoMetDC	S-adenosylmethionindekarboxyláza
APAO	acetylpolyamintransferáza
Az	antienzym
AzI	antienzymový inhibitor
BLM-A5	bleomycin
CDK	cyklin-dependentní kináza
DCM	dichlormethan
DEAD	diethyl azodikarboxylát
DFMO	difluormethylornithin
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
MATE1	multidrug and toxin extrusion transporter-1
MD simulace	molekulárně-dynamické simulace
MTA	5'-methylthioadenosin
MTs	membránové transportéry
ODC	ornithin dekarboxyláza
PA	polyaminy
PK/PD	farmakokinetika/farmakodynamika
PSVs	polyaminové sekvestrační vezikuly
PTS	polyaminový transportní systém
Put	putrescin
ROS	reactive oxygen species
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	structure-activity relationship
SLC	solute-carrier (family)
SMO	sperminoxidáza

Spd	spermidin
Spm	spermin
SSAT	spermin/spermidin acetyltransferáza
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie

8. Seznam použité literatury

- (1) Palmer, A. J.; Wallace, H. M. *Amino Acids* **2010**, *38*, 415.
- (2) Chari, R. V. *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 98.
- (3) Palmer, A. J.; Ghani, R. A.; Kaur, N.; Phanstiel, O.; Wallace, H. M. *Biochem J* **2009**, *424*, 431.
- (4) Wang, C.; Delcros, J. G.; Biggerstaff, J.; Phanstiel, O. t. *J Med Chem* **2003**, *46*, 2663.
- (5) Wallace, H. M.; Fraser, A. V. *Biochem Soc Trans* **2003**, *31*, 393.
- (6) Thomas, T.; Thomas, T. J. *Cell Mol Life Sci* **2001**, *58*, 244.
- (7) Seiler, N.; Sarhan, S.; Grauffel, C.; Jones, R.; Knodgen, B.; Moulinoux, J. P. *Cancer Res* **1990**, *50*, 5077.
- (8) Phanstiel, O. t.; Kaur, N.; Delcros, J. G. *Amino Acids* **2007**, *33*, 305.
- (9) Wallace, H. M.; Fraser, A. V.; Hughes, A. *Biochem J* **2003**, *376*, 1.
- (10) Coleman, C. S.; Hu, G.; Pegg, A. E. *Biochem J* **2004**, *379*, 849.
- (11) Iyer, R. K.; Kim, H. K.; Tsoa, R. W.; Grody, W. W.; Cederbaum, S. D. *Mol Genet Metab* **2002**, *75*, 209.
- (12) Pegg, A. E. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 880.
- (13) Igarashi, K.; Kashiwagi, K. *Int J Biochem Cell Biol* **2010**, *42*, 39.
- (14) Yan, D.-H.; Nishimura, K.; Yoshida, K.; Nakahira, K.; Ehara, T.; Igarashi, K.; Ishihara, K. *The Journal of Physiology* **2005**, *563*, 713.
- (15) Schuster, I.; Bernhardt, R. *Biomolecular concepts* **2011**, *2*, 79.
- (16) Yatin, M. *J Cell Mol Biol* **2002**, *1*, 57.
- (17) N., S. **1994**, pp 1.
- (18) Yu, H.; Yoo, P. K.; Aguirre, C. C.; Tsoa, R. W.; Kern, R. M.; Grody, W. W.; Cederbaum, S. D.; Iyer, R. K. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **2003**, *51*, 1151.
- (19) Castagnolo, D.; Schenone, S.; Botta, M. *Chemical reviews* **2011**, *111*, 5247.
- (20) Tabor, C. W.; Tabor, H. *Annual review of biochemistry* **1984**, *53*, 749.
- (21) Urdiales, J. L.; Medina, M. A.; Sanchez-Jimenez, F. *European journal of gastroenterology & hepatology* **2001**, *13*, 1015.
- (22) Larque, E.; Sabater-Molina, M.; Zamora, S. *Nutrition* **2007**, *23*, 87.
- (23) Pegg, A. E.; Michael, A. J. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2010**, *67*, 113.
- (24) Wu, H.; Min, J.; Ikeguchi, Y.; Zeng, H.; Dong, A.; Loppnau, P.; Pegg, A. E.; Plotnikov, A. N. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8331.
- (25) Wu, H.; Min, J.; Zeng, H.; McCloskey, D. E.; Ikeguchi, Y.; Loppnau, P.; Michael, A. J.; Pegg, A. E.; Plotnikov, A. N. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 16135.
- (26) Ikeguchi, Y.; Bewley, M. C.; Pegg, A. E. *Journal of biochemistry* **2006**, *139*, 1.
- (27) Wang, Y.; Casero, R. A., Jr. *Journal of biochemistry* **2006**, *139*, 17.
- (28) Murakami, Y.; Matsufuji, S.; Kameji, T.; Hayashi, S.; Igarashi, K.; Tamura, T.; Tanaka, K.; Ichihara, A. *Nature* **1992**, *360*, 597.
- (29) Kahana, C. *Essays Biochem* **2009**, *46*, 47.
- (30) Kahana, C. *Cell Mol Life Sci* **2009**, *66*, 2479.
- (31) Murakami, Y.; Matsufuji, S.; Hayashi, S.; Tanahashi, N.; Tanaka, K. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *267*, 1.
- (32) Matsufuji, S.; Matsufuji, T.; Miyazaki, Y.; Murakami, Y.; Atkins, J. F.; Gesteland, R. F.; Hayashi, S. *Cell* **1995**, *80*, 51.
- (33) Rom, E.; Kahana, C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 3959.
- (34) Kahana, C. *Methods Mol Biol* **2011**, *720*, 269.
- (35) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Trends in biochemical sciences* **2005**, *30*, 630.

- (36) Gilmour, S. K.; Birchler, M.; Smith, M. K.; Rayca, K.; Mostochuk, J. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **1999**, *10*, 739.
- (37) Ray, R. M.; Zimmerman, B. J.; McCormack, S. A.; Patel, T. B.; Johnson, L. R. *Am J Physiol* **1999**, *276*, C684.
- (38) Poulin, R.; Casero, R. A.; Soulet, D. *Amino Acids* **2012**, *42*, 711.
- (39) Adair, G. M.; Siciliano, M. J. *Mol Cell Biol* **1985**, *5*, 109.
- (40) Byers, T. L.; Wechter, R.; Nuttall, M. E.; Pegg, A. E. *Biochem J* **1989**, *263*, 745.
- (41) Rinehart, C. A., Jr.; Chen, K. Y. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 4750.
- (42) Feige, J. J.; Chambaz, E. M. *Biochim Biophys Acta* **1985**, *846*, 93.
- (43) Gawel-Thompson, K.; Greene, R. M. *J Cell Physiol* **1988**, *136*, 237.
- (44) Nicolet, T. G.; Scemama, J. L.; Pradayrol, L.; Seva, C.; Vaysse, N. *Biochem J* **1990**, *269*, 629.
- (45) Kumagai, J.; Johnson, L. R. *Am J Physiol* **1988**, *254*, G81.
- (46) Poulin, R.; Lessard, M.; Zhao, C. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 1695.
- (47) Poulin, R.; Zhao, C.; Verma, S.; Charest-Gaudreault, R.; Audette, M. *Biochem J* **1998**, *330 (Pt 3)*, 1283.
- (48) Kakinuma, Y.; Hoshino, K.; Igarashi, K. *Eur J Biochem* **1988**, *176*, 409.
- (49) Kavanaugh, M. P. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5781.
- (50) Busch, A. E.; Quester, S.; Ulzheimer, J. C.; Waldegger, S.; Gorboulev, V.; Arndt, P.; Lang, F.; Koepsell, H. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 32599.
- (51) Koepsell, H.; Lips, K.; Volk, C. *Pharm Res* **2007**, *24*, 1227.
- (52) Pohjanpelto, P. *The Journal of cell biology* **1976**, *68*, 512.
- (53) Minchin, R. F.; Martin, R. L. *Int J Biochem Cell Biol* **1997**, *29*, 447.
- (54) Munro, G. F.; Hercules, K.; Morgan, J.; Sauerbier, W. *J Biol Chem* **1972**, *247*, 1272.
- (55) Munro, G. F.; Miller, R. A.; Bell, C. A.; Verderber, E. L. *Biochim Biophys Acta* **1975**, *411*, 263.
- (56) Poulin, R.; Wechter, R. S.; Pegg, A. E. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 6142.
- (57) Mitchell, J. L.; Judd, G. G.; Leyser, A.; Choe, C. *Biochem J* **1998**, *329 (Pt 3)*, 453.
- (58) Kapyaho, K.; Janne, J. *Biochim Biophys Acta* **1982**, *714*, 93.
- (59) Seiler, N.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. *Int J Biochem Cell Biol* **1996**, *28*, 843.
- (60) Torossian, K.; Audette, M.; Poulin, R. *Biochem J* **1996**, *319 (Pt 1)*, 21.
- (61) Burns, M. R.; Carlson, C. L.; Vanderwerf, S. M.; Ziemer, J. R.; Weeks, R. S.; Cai, F.; Webb, H. K.; Graminski, G. F. *J Med Chem* **2001**, *44*, 3632.
- (62) Covassin, L.; Desjardins, M.; Soulet, D.; Charest-Gaudreault, R.; Audette, M.; Poulin, R. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*, 3267.
- (63) Graminski, G. F.; Carlson, C. L.; Ziemer, J. R.; Cai, F.; Vermeulen, N. M.; Vanderwerf, S. M.; Burns, M. R. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 35.
- (64) Huber, M.; Pelletier, J. G.; Torossian, K.; Dionne, P.; Gamache, I.; Charest-Gaudreault, R.; Audette, M.; Poulin, R. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 27556.
- (65) Seiler, N.; Dezeure, F. *Int J Biochem* **1990**, *22*, 211.
- (66) Seiler, N. *Curr Drug Targets* **2003**, *4*, 565.
- (67) Bergeron, R. J.; Seligsohn, H. W. *Bioorganic Chemistry* **1986**, *14*, 345.
- (68) Lessard, M.; Zhao, C.; Singh, S. M.; Poulin, R. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 1685.
- (69) Garcia-Faroldi, G.; Rodriguez, C. E.; Urdiales, J. L.; Perez-Pomares, J. M.; Davila, J. C.; Pejler, G.; Sanchez-Jimenez, F.; Fajardo, I. *PLoS One* **2010**, *5*, e15071.
- (70) Masuko, T.; Kusama-Eguchi, K.; Sakata, K.; Kusama, T.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Williams, K.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K. *J Neurochem* **2003**, *84*, 610.
- (71) Aziz, S. M.; Yatin, M.; Worthen, D. R.; Lipke, D. W.; Crooks, P. A. *J Pharm Biomed Anal* **1998**, *17*, 307.
- (72) Cullis, P. M.; Green, R. E.; Merson-Davies, L.; Travis, N. *Chem Biol* **1999**, *6*, 717.

- (73) Soulet, D.; Covassin, L.; Kaouass, M.; Charest-Gaudreault, R.; Audette, M.; Poulin, R. *Biochem J* **2002**, *367*, 347.
- (74) Soulet, D.; Gagnon, B.; Rivest, S.; Audette, M.; Poulin, R. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 49355.
- (75) Belting, M.; Mani, K.; Jonsson, M.; Cheng, F.; Sandgren, S.; Jonsson, S.; Ding, K.; Delcros, J. G.; Fransson, L. A. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 47181.
- (76) Uemura, T.; Stringer, D. E.; Blohm-Mangone, K. A.; Gerner, E. W. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2010**, *299*, G517.
- (77) Abdulhussein, A. A.; Wallace, H. M. *Amino Acids* **2014**, *46*, 655.
- (78) Koepsell, H. *Annu Rev Physiol* **1998**, *60*, 243.
- (79) Koepsell, H. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, *25*, 375.
- (80) Otsuka, M.; Matsumoto, T.; Morimoto, R.; Arioka, S.; Omote, H.; Moriyama, Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17923.
- (81) Winter, T. N.; Elmquist, W. F.; Fairbanks, C. A. *Mol Pharm* **2011**, *8*, 133.
- (82) Meyer zu Schwabedissen, H. E.; Verstuyft, C.; Kroemer, H. K.; Becquemont, L.; Kim, R. B. *Am J Physiol Renal Physiol* **2010**, *298*, F997.
- (83) Palacin, M.; Kanai, Y. *Pflugers Arch* **2004**, *447*, 490.
- (84) Uemura, T.; Gerner, E. W. *Methods Mol Biol* **2011**, *720*, 339.
- (85) Babbar, N.; Gerner, E. W. *Recent Results Cancer Res* **2011**, *188*, 49.
- (86) Wood, P. L.; Khan, M. A.; Smith, T.; Goodenowe, D. B. *Lipids Health Dis* **2011**, *10*, 214.
- (87) Uemura, T.; Yerushalmi, H. F.; Tsapraillis, G.; Stringer, D. E.; Pastorian, K. E.; Hawel, L., 3rd; Byus, C. V.; Gerner, E. W. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 26428.
- (88) Xie, X.; Gillies, R. J.; Gerner, E. W. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 20484.
- (89) Daigle, N. D.; Carpentier, G. A.; Frenette-Cotton, R.; Simard, M. G.; Lefoll, M. H.; Noel, M.; Caron, L.; Noel, J.; Isenring, P. *J Cell Physiol* **2009**, *220*, 680.
- (90) Okabe, M.; Unno, M.; Harigae, H.; Kaku, M.; Okitsu, Y.; Sasaki, T.; Mizoi, T.; Shiiba, K.; Takanaga, H.; Terasaki, T.; Matsuno, S.; Sasaki, I.; Ito, S.; Abe, T. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *333*, 754.
- (91) Aouida, M.; Poulin, R.; Ramotar, D. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 6275.
- (92) Calcagno, A. M.; Ludwig, J. A.; Fostel, J. M.; Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V. *Mol Pharm* **2006**, *3*, 87.
- (93) Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, *55*, 3.
- (94) Baguley, B. C. *Mol Biotechnol* **2010**, *46*, 308.
- (95) Mizuno, N.; Sugiyama, Y. *Drug Metab Pharmacokinet* **2002**, *17*, 93.
- (96) Petzinger, E.; Geyer, J. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2006**, *372*, 465.
- (97) Takano, M.; Yumoto, R.; Murakami, T. *Pharmacol Ther* **2006**, *109*, 137.
- (98) Wallace, H. M.; Fraser, A. V. *Amino Acids* **2004**, *26*, 353.
- (99) Cipolla, B.; Bansard, J. Y.; Moulinoux, J. P. *Urology*, *68*, 196.
- (100) Barret, J. M.; Kruczynski, A.; Vispe, S.; Annereau, J. P.; Brel, V.; Guminski, Y.; Delcros, J. G.; Lansiaux, A.; Guilbaud, N.; Imbert, T.; Bailly, C. *Cancer Res* **2008**, *68*, 9845.
- (101) Wheelhouse, R. T. **1990**.
- (102) Holley, J. L.; Mather, A.; Wheelhouse, R. T.; Cullis, P. M.; Hartley, J. A.; Bingham, J. P.; Cohen, G. M. *Cancer Res* **1992**, *52*, 4190.
- (103) Cullis, P. M.; Green, R. E.; Malone, M. E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1995**, 1503.
- (104) Green, R. E., College of Medicine, Biological Sciences and Psychology, 1996.
- (105) Travis, N. G., Toxicology, 1998.
- (106) Albert, A. *The acridines: their preparation, physical, chemical, and biological properties and uses*; Edward Arnold, 1966.
- (107) Waring, M.; Ponder, B. A. *The Search for New Anticancer Drugs*; Springer Netherlands, 1992.

- (108) McDonald, L. A.; Eldredge, G. S.; Barrows, L. R.; Ireland, C. M. *J Med Chem* **1994**, *37*, 3819.
- (109) S. Blagbrough, I.; Taylor, S.; Taylor, S.; L. Carpenter, M.; Novoselskiy, V.; Shamma, T.; S. Haworth, I. *Chemical Communications* **1998**, 929.
- (110) Wang, L.; Price, H. L.; Juusola, J.; Kline, M.; Phanstiel, O. t. *J Med Chem* **2001**, *44*, 3682.
- (111) Cheng, L. L.; Wu, C.; Smith, M. R.; Gonzalez, R. G. *FEBS letters* **2001**, *494*, 112.
- (112) Srinath, P.; McQuarrie, S. A.; Suresh, M. R. *Nuclear medicine and biology* **2002**, *29*, 497.
- (113) Maurice, H. B.; Phillips, R.; Karodia, N. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *3*, 602.
- (114) Rao, K.; McBride, T.; Oleson, J. *Cancer Research* **1968**, *28*, 1952.
- (115) Linardi, M. d. C. F.; De Oliveira, M.; Sampaio, M. *Journal of medicinal chemistry* **1975**, *18*, 1159.
- (116) Ueda, S.; Umemura, T.; Dohguchi, K.; Matsuzaki, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 323.
- (117) Watanabe, N.; Forman, H. J. *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, *411*, 145.
- (118) Esteves-Souza, A.; Lucio, K. A.; Da Cunha, A. S.; Da Cunha Pinto, A.; Da Silva Lima, E. L.; Camara, C. A.; Vargas, M. D.; Gattass, C. R. *Oncology reports* **2008**, *20*, 225.
- (119) Bailly, C. *Current medicinal chemistry* **2000**, *7*, 39.
- (120) Zunino, F.; Dallavalle, S.; Laccabuea, D.; Beretta, G.; Merlini, L.; Pratesi, G. *Current pharmaceutical design* **2002**, *8*, 2505.
- (121) Pommier, Y. *Seminars in oncology* **1996**, *23*, 3.
- (122) Dallavalle, S.; Giannini, G.; Alloatti, D.; Casati, A.; Marastoni, E.; Musso, L.; Merlini, L.; Morini, G.; Penco, S.; Pisano, C.; Tinelli, S.; De Cesare, M.; Beretta, G. L.; Zunino, F. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 5177.
- (123) Seliga, R.; Pilatova, M.; Sarissky, M.; Viglasky, V.; Walko, M.; Mojzis, J. *Molecular Biology Reports* **2013**, *40*, 4129.
- (124) Stoica, S.; Magoulas, G. E.; Antoniou, A. I.; Suleiman, S.; Cassar, A.; Gatt, L.; Papaioannou, D.; Athanassopoulos, C. M.; Schembri-Wismayer, P. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26*, 1145.
- (125) Wang, C.; Delcros, J. G.; Biggerstaff, J.; Phanstiel, O. t. *J Med Chem* **2003**, *46*, 2672.
- (126) Wang, C.; Delcros, J. G.; Cannon, L.; Konate, F.; Carias, H.; Biggerstaff, J.; Gardner, R. A.; Phanstiel, I. V. O. t. *J Med Chem* **2003**, *46*, 5129.
- (127) Xie, S. Q.; Liu, G. C.; Ma, Y. F.; Cheng, P. F.; Wu, Y. L.; Wang, M. W.; Ji, B. S.; Zhao, J.; Wang, C. J. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2008**, *22*, 352.
- (128) Traquete, R.; Ghani, R. A.; Phanstiel, O.; Wallace, H. M. *Amino Acids* **2013**, *44*, 1193.
- (129) Annereau, J. P.; Brel, V.; Dumontet, C.; Guminski, Y.; Imbert, T.; Broussas, M.; Vispe, S.; Breand, S.; Guilbaud, N.; Barret, J. M.; Bailly, C. *Leukemia research* **2010**, *34*, 1383.
- (130) Brel, V.; Annereau, J. P.; Vispe, S.; Kruczynski, A.; Bailly, C.; Guilbaud, N. *Biochemical pharmacology* **2011**, *82*, 1843.
- (131) Gentry, A. C.; Pitts, S. L.; Jablonsky, M. J.; Bailly, C.; Graves, D. E.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3240.
- (132) Kruczynski, A.; Pillon, A.; Creancier, L.; Vandenberghe, I.; Gomes, B.; Brel, V.; Fournier, E.; Annereau, J. P.; Currie, E.; Guminski, Y.; Bonnet, D.; Bailly, C.; Guilbaud, N. *Leukemia* **2013**, *27*, 2139.
- (133) Kruczynski, A.; Vandenberghe, I.; Pillon, A.; Pesnel, S.; Goetsch, L.; Barret, J. M.; Guminski, Y.; Le Pape, A.; Imbert, T.; Bailly, C.; Guilbaud, N. *Investigational new drugs* **2011**, *29*, 9.

- (134) Leblond, P.; Boulet, E.; Bal-Mahieu, C.; Pillon, A.; Kruczynski, A.; Guilbaud, N.; Bailly, C.; Sarrazin, T.; Lartigau, E.; Lansiaux, A.; Meignan, S. *Investigational new drugs* **2014**, *32*, 883.
- (135) Mouawad, F.; Gros, A.; Rysman, B.; Bal-Mahieu, C.; Bertheau, C.; Horn, S.; Sarrazin, T.; Lartigau, E.; Chevalier, D.; Bailly, C.; Lansiaux, A.; Meignan, S. *Oral oncology* **2014**, *50*, 113.
- (136) De Botton, S.; Berthon, C.; Bulabois, C.; Prebet, T.; Vey, N.; Chevallier, P. In *EHA 17th Congress, Amsterdam 2012*, p 14.
- (137) Bissery, M. C.; Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Lavelle, F. *Cancer Res* **1991**, *51*, 4845.
- (138) Venditti, J. M. *Seminars in oncology*, *8*, 349.
- (139) Ballot, C.; Jendoubi, M.; Kluza, J.; Jonneaux, A.; Laine, W.; Formstecher, P.; Bailly, C.; Marchetti, P. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2012**, *17*, 364.
- (140) Tierny, D.; Serres, F.; Segaoula, Z.; Bemelmans, I.; Bouchaert, E.; Petain, A.; Brel, V.; Couffin, S.; Marchal, T.; Nguyen, L.; Thuru, X.; Ferre, P.; Guilbaud, N.; Gomes, B. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2015**, *21*, 5314.
- (141) Marconato, L.; Gelain, M. E.; Comazzi, S. *Hematological oncology* **2013**, *31*, 1.
- (142) Flory, A. B.; Rassnick, K. M.; Balkman, C. E.; Kiselow, M. A.; Autio, K.; Beaulieu, B. B.; Lewis, L. D. *American journal of veterinary research* **2008**, *69*, 1316.
- (143) Igwemezie, L. N.; Kaul, S.; Barbhuiya, R. H. *Pharm Res* **1995**, *12*, 117.
- (144) Lana, S.; U'Ren, L.; Plaza, S.; Elmslie, R.; Gustafson, D.; Morley, P.; Dow, S. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **2007**, *21*, 764.
- (145) Willmann, M.; Mullauer, L.; Schwendenwein, I.; Wolfesberger, B.; Kleiter, M.; Pagitz, M.; Hadzijusufovic, E.; Shibly, S.; Reifinger, M.; Thalhammer, J. G.; Valent, P. *In vivo* **2009**, *23*, 911.
- (146) Hohenhaus, A. E.; Matus, R. E. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **1990**, *4*, 239.
- (147) Palermo, G.; Minniti, E.; Greco, M. L.; Riccardi, L.; Simoni, E.; Convertino, M.; Marchetti, C.; Rosini, M.; Sissi, C.; Minarini, A.; De Vivo, M. *Chem Commun (Camb)* **2015**, *51*, 14310.
- (148) Deweese, J. E.; Osheroff, N. *Nucleic acids research* **2009**, *37*, 738.
- (149) Wu, C.-C.; Li, T.-K.; Farh, L.; Lin, L.-Y.; Lin, T.-S.; Yu, Y.-J.; Yen, T.-J.; Chiang, C.-W.; Han, N.-L. *Science* **2011**, *333*, 459.
- (150) Deweese, J. E.; Burch, A. M.; Burgin, A. B.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1862.
- (151) Deweese, J. E.; Burgin, A. B.; Osheroff, N. *Nucleic acids research* **2008**, *36*, 4883.
- (152) Deweese, J. E.; Guengerich, F. P.; Burgin, A. B.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8940.
- (153) Palermo, G.; Minniti, E.; Greco, M. L.; Riccardi, L.; Simoni, E.; Convertino, M.; Marchetti, C.; Rosini, M.; Sissi, C.; Minarini, A. *Chemical Communications* **2015**, *51*, 14310.
- (154) Deweese, J. E.; Osheroff, N. *Metallomics* **2010**, *2*, 450.
- (155) Palermo, G.; Stenta, M.; Cavalli, A.; Dal Peraro, M.; De Vivo, M. *Journal of chemical theory and computation* **2013**, *9*, 857.
- (156) Sissi, C.; Palumbo, M. *Nucleic acids research* **2009**, *37*, 702.
- (157) Schmidt, B. H.; Burgin, A. B.; Deweese, J. E.; Osheroff, N.; Berger, J. M. *Nature* **2010**, *465*, 641.
- (158) Gentry, A. C.; Pitts, S. L.; Jablonsky, M. J.; Bailly, C.; Graves, D. E.; Osheroff, N. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3240.
- (159) Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Izatt, R. M. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4475.

- (160) Karigiannis, G.; Papaioannou, D. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 2000, 1841.
- (161) Kuksa, V.; Buchan, R.; Kong Thoo Lin, P. *Synthesis* **2000**, 2000, 1189.
- (162) Salvatore, R. N.; Yoon, C. H.; Jung, K. W. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7785.
- (163) Olsen, C. A.; Franzyk, H.; Jaroszewski, J. W. *Synthesis* **2005**, 2005, 2631.
- (164) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley, 2006.
- (165) Denton, T. T.; Joyce, A. S.; Kiely, D. E. *The Journal of organic chemistry* **2007**, 72, 4997.
- (166) Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 6373.
- (167) Maiti, D.; Fors, B. P.; Henderson, J. L.; Nakamura, Y.; Buchwald, S. L. *Chemical Science* **2011**, 2, 57.
- (168) Fors, B. P.; Watson, D. A.; Biscoe, M. R.; Buchwald, S. L. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 13552.
- (169) Gucky, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Reznickova, E.; Beres, T.; Strnad, M.; Krystof, V. *J Med Chem* **2013**, 56, 6234.
- (170) Muller, D.; Zeltser, I.; Bitan, G.; Gilon, C. *The Journal of organic chemistry* **1997**, 62, 411.
- (171) Meyers, C. L. F.; Borch, R. F. *Organic Letters* **2001**, 3, 3765.
- (172) Muth, A.; Kamel, J.; Kaur, N.; Shicora, A. C.; Ayene, I. S.; Gilmour, S. K.; Phanstiel, O. t. *J Med Chem* **2013**, 56, 5819.