

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu
a jejich protinádorová aktivita**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Malínková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6.5.2011

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 6.5.2011

.....

Děkuji RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. za taktní odborné vedení, cenné rady a kritické připomínky, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce se zájmem poskytoval. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, zejména Mgr. Tomáši Pospíšilovi, D.E.A., Mgr. Václavu Mikovi a Bc. Zdeně Kamarádové za vstřícnost a praktické rady.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Veronika Malínková
Název práce	Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu a jejich protinádorová aktivita
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Práce je zaměřena na syntézu a studium biologické aktivity nových C2, C6, N9-trisubstituovaných purinových inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDK), jejichž struktura je odvozena od molekuly roskovitinu. V teoretické části byla provedena literární rešerše CDK inhibitorů, jejich biologických účinků, metabolismu, vývoje a syntézy. Praktická část zahrnuje přípravu dvou nových CDK inhibitorů, které by byly účinnější než roskovitin a zároveň měly vyšší metabolickou stabilitu, zejména v pozici C2, kde v případě roskovitinu dochází k oxidaci hydroxyly primárního aminoalkoholu. Dále bylo provedeno biologické testování nově připravených látek. Byla stanovena cytotoxicita na různé nádorové linie a IC₅₀ pomocí inhibičního kinázového testu.</p>
Klíčová slova	antiproliferační aktivita, protinádorové účinky, kinázy, cyklin dependentní kinázy, cykliny, inhibitory CDK, 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu, roskovitin, olomoucín II
Počet stran	41
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Veronika Malínková
Title	Synthesis of 2,6,9-trisubstituted derivatives of purine and their anticancer activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>The work is focused on synthesis and study of biological activity of new C2, C6, N9-trisubstituted purine inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) structurally derived from roscovitine. In the theoretical part, the most recent literature concerning to CDKs inhibitors, involving their biological effects, metabolism, development and synthesis is reviewed. The practical part describes preparation of two new CDKs inhibitors. They supposed to be more biologically active and have better metabolic stability than roscovitine. The problem in metabolic stability of roscovitine is oxidation of primary alcohol in the amino-alcohol moiety at the C2 position. The practical part includes also the biological tests performed with new compounds. The cytotoxicity was tested on various cancer cell lines and IC_{50} was determined using the kinase inhibition assay.</p>
Keywords	antiproliferative activity, anti-tumor effects, kinases, cyclin-dependent kinases, cyclins, CDK inhibitors, 2,6,9-trisubstituted purine derivatives, roscovitine, olomoucine II
Number of pages	41

Number of appendices	4
Language	Czech

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	8
2	LITERÁRNÍ REŠERŠE DANÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Úvod	9
2.2	Cyklin dependentní kinázy	10
2.2.1	Role komplexů CDK/cyklin v buněčném cyklu	10
2.3	Inhibitory cyklin dependentních kináz	11
2.3.1	Biologické účinky inhibitorů CDK	12
2.3.2	Inhibitory CDK, rakovina a jiná onemocnění.....	13
2.4	2,6,9- trisubstituované purinové deriváty jako inhibitory CDK	15
2.4.1	Vývoj 2,6,9- trisubstituovaných purinových inhibitorů CDK	15
2.4.2	Vztah struktury a aktivity 2,6,9 – trisubstituovaných purinových derivátů (SAR)	17
2.4.3	Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu.....	18
2.4.4	Metabolismus 2,6,9- trisubstituovaných derivátů purinu	20
3	MATERIÁL.....	23
3.1	Analytické metody	23
3.2	Použité chemikálie	23
3.3	Použité pufrы pro kinázový test	23
4	METODIKA.....	24
4.1	Příprava prekurzorů pro C2 substituci	24
4.1.1	1,1-dimethylglycinol.....	24
4.1.2	1,1-Dimethyl-L-alaninol.....	25
4.2	Příprava purinového prekurzoru.....	26
4.2.1	Příprava 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurinu	26
4.3	Příprava nových 2,6,9 – trisubstituovaných derivátů purinu.....	27

4.3.1	4-chlor-2- {[2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino] –methyl} –fenol (látka 1).....	27
4.3.2	4-chlor-2- {[2-((<i>S</i>)-2-hydroxy-1,2-dimethyl-propylamino)-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino] –methyl} –fenol (látka 2)	28
4.4	Testování připravených CDK inhibitorů	29
4.4.1	Kinázoový inhibiční test.....	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	Příprava prekurzorů pro C2 substituci	30
5.1.1	1,1-dimethylglycinol.....	30
5.1.2	1,1-dimethyl-L-alaninol	30
5.2	Příprava purinového prekurzoru.....	31
5.2.1	2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurin	31
5.3	Příprava nových 2,6,9 – trisubstituovaných derivátů purinu.....	31
5.3.1	4-chlor-2- {[2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino] –methyl} –fenol (látka 1).....	31
5.3.2	4-chlor-2- {[2-((<i>S</i>)-2-hydroxy-1,2-dimethyl-propylamino)-9-isopropyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino] –methyl} –fenol (látka 2)	31
5.4	Testování připravených CDK inhibitorů	32
5.4.1	Kinázoový inhibiční test.....	32
5.4.2	Cytotoxicita	33
6	DISKUSE	34
7	ZÁVĚR	35
8	POUŽITÁ LITERATURA	36
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	40
10	PŘÍLOHY	42

1 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla literární rešerše dané problematiky, syntéza prekurzorů C2 purinové substituce, syntéza účinnějších derivátů roskovitinu s vyšší metabolickou stabilitou a posléze studium biologické aktivity připravených sloučenin.

2 LITERÁRNÍ REŠERŠE DANÉ PROBLEMATIKY

2.1 Úvod

Komplexy cyklinů a cyklin dependentních kináz hrají významnou roli v buněčném cyklu. Nádorové buňky se vyznačují častou deregulací buněčného cyklu, což vedlo k aktivnímu hledání uměle syntetizovaných kinázových inhibitorů s vysokou afinitou a specifitou k cyklin-dependentním kinázám, které by mohly sloužit jako potenciální chemoterapeutika cílená zejména proti nádorovým onemocněním (Legraverend *et al.*, 1999). Prvním syntetizovaným specifickým CDK inhibitorem, patřící do skupiny 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu, byl olomoucín selektivně inhibující CDK1 a CDK2 (Veselý *et al.*, 1994). Studium vztahu struktury a aktivity byly vyvinuty další účinnější inhibitory jako roskovitin, bohemín a olomoucín II.

Bylo zjištěno, že struktura substituentů v pozicích C2, N6, N9 výrazně ovlivňuje biologickou aktivitu těchto látek. Vhodná struktura je taktéž důležitá při metabolismu těchto látek. Bylo prokázáno, že alifatický hydroxylový řetězec olomoucínu, bohemínu a R-roskovitinu v C2 pozici je citlivý k hlavním metabolickým reakcím (konjugační reakce, oxidační reakce; Červenková *et al.*, 2003). Nevýhodou vzniklé karboxylové kyseliny, která tvoří majoritní složku metabolitů, je nižší inhibiční aktivita, což je nežádoucí. Taktéž dochází k N-dealkylaci isopropylvé skupiny v poloze N9. Tento metabolit ale tvoří minoritní složku z celkového množství metabolitů (Nutley *et al.*, 2005). Cílem je tedy připravit takovou látku, která by blokovala progresi buněčného cyklu, indukovala apoptózu, vykazovala silné protinádorové účinky a byla odolná vůči hlavním metabolickým procesům.

2.2 Cyklin dependentní kinázy

Savčí buněčný cyklus je řízen cyklin dependentními kinázami (CDK), jejichž činnost je ovlivňována aktivátory (cykliny) nebo inhibitory (INK4 a Cip/Kip inhibitory; Malumbres *et al.*, 2009). Cyklin dependentní kinázy jsou Ser/Thr kinázy, které fosforylují cílové proteiny, tedy umožňují přenos fosfátové skupiny z ATP na postranní řetězec aminokyseliny daného proteinu (Alberts *et al.*, 1998). Struktura cyklin dependentních kináz se skládá ze dvou domén, N-terminální domény složené převážně z β listů a C-terminální domény složené z α -helixů. Mezi touto N- a C-terminální doménou se nachází vazebné místo pro ATP či inhibitor (Otyepka *et al.*, 2000).

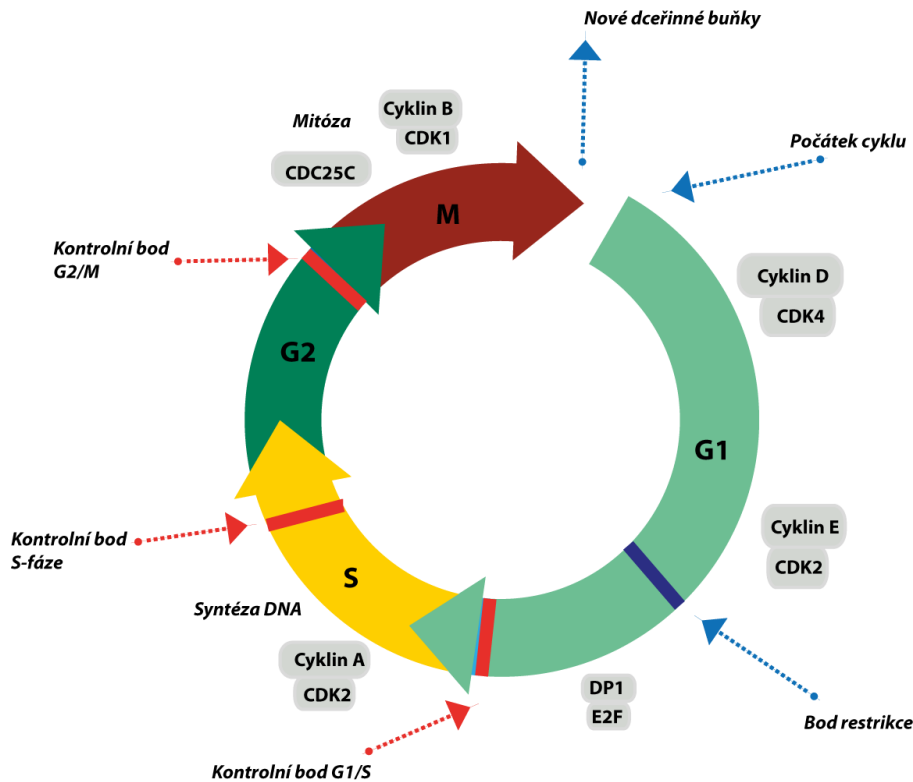
Cyklín dependentní kinázy jsou v buněčném cyklu neustále, pouze jejich aktivita je závislá na cyklinu. Po navázání cyklinu na CDK vzniká komplex složený z katalyzující podjednotky (CDK) a podjednotky regulační (cyklin; Alberts *et al.*, 1998). Tento komplex je aktivovaný fosforylací threoninu (Thr14) nebo tyrosinu (Tyr15) molekuly CDK. Fosforylace je prováděna pomocí Wee-1 kinázy, díky které komplex cyklin-CDK zůstává neaktivní, až do doby defosforylace tyrosinu fosfatázou cdc25 (Fattaey *et al.*, 1997).

2.2.1 Role komplexů CDK/cyklín v buněčném cyklu

V buněčném cyklu jsou obsaženy cykliny dependentní kinázy metafázické (CDK2, CDK4 a CDK6), mitotické (CDK1 – známá i jako Cdc2) a 10 cyklinů dělicí se do 4 tříd (cykliny A, B, D, a E; Malumbres *et al.*, 2009). Cyklin dependentní kinázy regulují průběh buněčného cyklu v G1, S a M fázi („Obr. 1“; Fischer *et al.*, 2000).

V G1 fázi extracelulární signály modulují aktivaci CDK4 a CDK6, které jsou spojené s cykliny D. Tyto komplexy fosforylují a inaktivují retinoblastoma protein (Rb protein), což vede k uvolnění transkripčních faktorů E2F a DP1, které ovlivňují expresi genů potřebné pro přechod G1/S a S-fázi buněčného cyklu (Fischer *et al.*, 2000). V pozdní fázi G1 se nachází hlavní kontrolní bod buněčného cyklu. V tomto bodě dochází k aktivaci CDK2/cyklín E, která je řízena CDK inhibitory p21 a p27. V případě poškození DNA je indukce inhibitoru p21 zprostředkována pomocí proteinu p53 (Malumbres *et al.*, 2009).

Během S-fáze dochází ke změně cyklinu CDK2 z cyklinu E na cyklin A, což způsobí inaktivaci transkripčního faktoru E2F. Ke konci S-fáze dochází k syntéze cyklinů B aktivujících CDK1. Aby byl možný přechod z S-fáze do anafáze je nutná degradace cyklinu B a inaktivace CDK1 (Knockaert *et al.*, 2002).



Obr. 1: Role CDK v buněčném cyklu.

2.3 Inhibitory cyklin dependentních kináz

Aktivita komplexů CDK/cyklin je regulována pomocí inhibitorů cyklin dependentních kináz (CKI) (Sherr *et Roberts*, 1999). Mnohdy jsou cyklin dependentní kinázy hyperaktivní v důsledku genetické či epigenetické události, která má vliv na jejich regulační dráhy. Selektivní inhibice cyklin dependentních kináz by tedy mohla docílit významného omezení progresu nádorových buněk v buněčném cyklu a mohla by navodit až buněčnou smrt (Lapenna *et Giordano*, 2009).

U savčích buněk jsou cyklin dependentní kinázy regulovány dvěma skupinami CDK inhibitorů: INK4 a Cip/Kip. INK4 se váží pouze na CDK4 a CDK6 a do této skupiny patří inhibitory p15, p16, p18 a p19. Do Cip/Kip skupiny patří inhibitory p21, p27 a p57. Tato skupina je typická pro svoji schopnost vázat se jak na cykliny, tak i na CDK podjednotky na rozdíl od rodiny INK4 (Malumbres *et Barbacid*, 2009; Rizzolio *et al.*, 2010; Sherr *et Roberts*, 1999).

Po zjištění, že CDK inhibitory jsou atraktivní jako potenciální protinádorová léčiva, zejména díky jejich antiproliferačním účinkům a indukci apoptózy na různých typech

nádorových liniích (Knockaert *et al.*, 2002), došlo k rozvoji syntézy mnoha strukturních motivů. Bylo připraveno několik hlavních tříd CDK inhibitorů, jako např. flavonoidy, puriny, stautosporin, butyrolakton-I, paullony a indigoidy (Fischer *et Lane*, 2000). I přes jejich odlišné struktury mají několik společných vlastností:

- 1) mají nízkou molekulovou hmotnost (<600),
- 2) jsou ploché hydrofobní heterocykly,
- 3) kompetují s molekulami ATP o volné ATP-vazebné místo na molekule CDK,
- 4) s kinázou se váží pomocí hydrofobních vazeb či vodíkových můstků (Knockaert *et al.*, 2002).

Podle selektivity dělíme uměle syntetizované CDK inhibitory do tří tříd. Na ty, které nejsou selektivní k žádné CDK (flavopiridol), na ty, které inhibují CDK1,2,5 (možná i CDK9) (olomoucín, R-roskovitin) a na ty, které inhibují CDK4,6 (CINK4; Knockaert *et al.*, 2002).

2.3.1 Biologické účinky inhibitorů CDK

Inhibicí cyklin dependentních kináz v průběhu buněčného cyklu dochází k defosforylaci jejich přirozených substrátů (např. Rb protein, E2F, DNA polymerasa α , survivin, laminy a další), čímž je mnoho mechanismů v buněčném cyklu narušeno. Například, nefosforylovaný Rb protein nereaguje s transkripčními faktory (E2F) a buňka tedy nemůže přejít z G1/S fáze do S-fáze buněčného cyklu (Wesierska-Gadek *et Kryštof*, 2009). Rovněž nefosforylovaný nukleofosmin způsobí poruchu oddělení centriol a centrozomu, kdy buňka nemůže přejít do S-fáze, jelikož nukleofosmin je vázán na centrozomy (Grisendi *et al.*, 2006).

CDK inhibitory jsou schopné rovněž regulovat transkripci. Bylo zjištěno, že po podání inhibitoru (např. roskovitin) dochází ke snížení syntézy mRNA. Inhibitor inhibuje fosforylaci na C-terminální doméně RNA polymerázy II (Wesierska-Gadek *et Kryštof*, 2009). Fosforylaci RNA polymerázy II uskutečňují CDK7 a CDK9, které jsou inhibitorem inhibovány. Neaktivní RNA polymeráza II je poté degradována.

Porušená transkripce má také za následek akumulaci nádorového supresoru p53 v aktivní formě (Wesierska-Gadek *et Kryštof*, 2009). p53 se vyznačuje svými protinádorovými mechanismy. Může zastavit buněčný cyklus v G1/S kontrolním bodě buněčného cyklu, jestliže dojde ke genotoxickým škodám. Pokud je DNA masivně poškozena, p53 spouští apoptotickou dráhu, která může končit až buněčnou smrtí. Po podání inhibitorů na nádorové buňky, u kterých je gen pro p53 nejčastěji mutovaným genem, dochází k indukci apoptózy, což je spojeno s potlačením transkripce (Golias *et al.*, 2004).

Inhibice transkripce má největší dopad na proteiny s krátkým poločasem rozpadu. Mezi tyto proteiny patří antiapoptický Mc1-1, XIAP a survivin. Vzhledem k jejich důležitosti v buňce může jejich nedostatek způsobit až apoptózu (Blagosklonny, 2004).

2.3.2 Inhibitory CDK, rakovina a jiná onemocnění

Nádorová buňka vykazuje šest základních změn v buněčné fyziologii, které společně určují maligní růst. Jedná se o soběstačnost růstových signálů, necitlivost k inhibitorům růstových signálů, vyhýbání se programované buněčné smrti, neomezený potenciál replikace, trvalá angiogeneze, tkáňová invaze a metastázování (Hanahan *et* Weinberg, 2000).

Deregulace cyklin dependentních kináz, a tím spojená overexprese některých cyklinů, a mutace endogenních CDK inhibitorů jako p16^{INK4a}, p21^{WAF} a p27^{Kip}, je společným rysem rakovinných buněk (McInnes, 2008; Lapenna *et* Giordano, 2009). Tyto buňky jsou typické pro neplánovanou proliferaci, genomickou (DNA mutace a chromozomální aberace) a chromozomální nestabilitu (změna počtu chromozomů; Malumbres *et* Barbacid, 2009).

U nádorů dochází k nadměrné expresi cyklinu D1. To je způsobeno inaktivací přírodního inhibitoru p16^{INK4A} (Shapiro *et al.*, 1995; Ruas *et al.*, 1998). Zvýšená exprese cyklinu D1 a jeho akumulace v jádrech nádorových buněk může vyplývat z chromozomální translokace a amplifikace genu (Diehl, 2002). Maligní buňky tedy unikají kontrole růstu a neomezeně se dělí. Overexprese cyklinu D1 a ztráta inhibitoru p16^{INK4A} způsobí zvýšení koncentrace CDK4, které se spojují v komplex buďto s cyklinem D nebo s Cip/Kip proteiny, což podporuje aktivaci cyklinu E/CDK2. Tato aktivace má za následek inaktivaci Rb proteinu jeho zvýšenou fosforylací. Inhibice aktivity cyklinu D - dependentní kinázy vede tedy ke snížení nádorového růstu, popřípadě i k buněčné smrti (Shapiro, 2006).

Konkrétněji, cyklin D1 je exprimován u nádorů příštítných tělísek, leukemie, rakoviny tlustého střeva, žaludku, jícnu, plic, ledvin a prsu. Aberantní aktivace CDK1 byla pozorována u několika primárních nádorů (prsu, tlustého střeva, prostaty, jícnu a plic) v důsledku overexprese cyklinu B1. CDK2 je deregulována u rakoviny plic, melanomu, osteosarkomu a ovariálního karcinomu, nejčastěji v důsledku overexprese cyklinu E a cyklinu A nebo inaktivací Cip/Kip inhibitorů. Transkripční kináza CDK9 je exprimována v myelomu a u rakoviny prostaty a plic (Lapenna *et* Giordano, 2009).

Po intenzivním studiu bylo zjištěno, že cyklin dependentní kinázy nehrají důležitou roli pouze u nádorových onemocnění, ale i u dalších chorob, např. Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, při onemocnění ledvin, mrtvici, ischemii, virových a parazitických onemocnění, diabetes mellitus 2. typu a dalších (Knockaert *et al.*, 2002; Galons *et al.*, 2010).

U neurogenerativních poruch nervového systému, jako Alzheimerova choroba či amyotrofni laterální skleróza, dochází k deregulaci CDK5, který je za normálních okolností aktivovaný proteiny p35 a p39. Při onemocnění dochází k přeměně těchto proteinů na proteiny p25 a p29, které s CDK5 fosforylují cytoskeletální proteiny (u Alzheimerovy choroby se jedná o protein tau, u amyotrofni laterální sklerózy neurofilamentový protein NF-H; Knockaert *et al.*, 2002).

Mezi kardiovaskulární onemocnění vhodné pro léčbu inhibitory patří ateroskleróza, restenoskleróza a srdeční hypertrofie (Knockaert *et al.*, 2002). Srdeční hypertrofie je onemocnění, při kterém je typické zesílení stěny levé komory srdce v důsledku zatížení. Dochází ke zvětšení velikosti srdečních myocytů, což je spojeno s jejich nadměrnou transkripcí a translací. To je způsobeno chronickou aktivací CDK9, který fosforyluje C-terminální doménu RNA-polymerázy II. CDK9 může tedy představovat nový cíl pro léky srdeční hypertrofie (Kryštof *et al.*, 2010).

Mezi nejčastější onemocnění ledvin patří IgA – nefropatie. Toto onemocnění se vyznačuje nadměrnou proliferací mezangiálních buněk a produkcí matrix. Po podání některých inhibitorů dojde k inhibici jejich tvorby, čímž dochází ke zlepšení stavu ledvin (Pippin *et al.*, 1997).

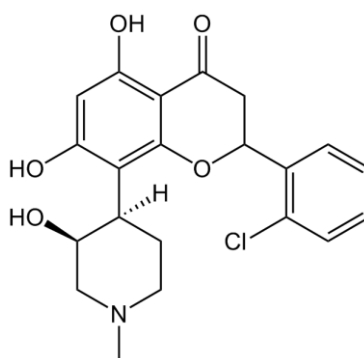
Inhibitory cyklin dependentních kináz mají možné využití i u virových onemocnění. Viry ke svému přežití potřebují aktivní cyklin dependentní kinázy pro jejich replikaci. Některé dokonce kódují své vlastní cykliny, čímž mohou ovlivňovat cyklus hostitelské buňky. Bylo prokázáno, že působením inhibitoru (např. roskovitin) na viry dojde k inhibici transkripce a DNA syntézy. Jedná se zejména o prozkoumané herpes simplex viry, lidské cytomegaloviry a papilomaviry (Knockaert *et al.*, 2002).

Inhibitory mohou také sloužit jako potenciální léčivo parazitických onemocnění, která postihují zejména africké státy. Jedná se hlavně o parazity jako *Trypanosoma cruzi* zodpovědná za spavou nemoc nebo *Plasmodium falciparum* způsobující malárii. Bylo zjištěno, že tyto parazitičtí prvoci mají některé klíčové molekuly (cyklin dependentní kinázy, cykliny) buněčného cyklu velmi podobné molekulám savčím (Knockaert *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že po podání některých inhibitorů mohou nastat dvě situace. Buďto inhibitor působí stejně na parazitické a lidské cyklin dependentní kinázy nebo může být selektivní pouze k savčím kinázám. Cílem je tedy vyrobit takové inhibitory, které by byly esenciální vůči parazitům a jejich vývoji, zároveň však musí být dostatečně rozdílné od savčích kináz, aby nedošlo k jejich ohrožení (Hammarton *et al.*, 2003).

2.4 2,6,9- trisubstituované purinové deriváty jako inhibitory CDK

2.4.1 Vývoj 2,6,9- trisubstituovaných purinových inhibitorů CDK

Jak již bylo řečeno, CDK inhibitory hrají důležitou roli v diferenciaci, proliferaci, stáří a programované smrti buněk (Chellappan *et al.*, 1998). Mezi první uměle syntetizované inhibitory, které byly klinicky zkoumány, patří flavopiridol („Obr. 2“) a 7-hydroxystaurosporin (Senderowicz *et al.*, 1998). Jelikož tyto inhibitory nebyly příliš selektivní, byla připravená druhá skupina inhibitorů, která měla selektivitu již vyšší a s ní i vyšší specifitu k vybraným cyklin dependentním kinázám (CDK1, CDK2, CDK5; Meijer *et Raymond*, 2003).



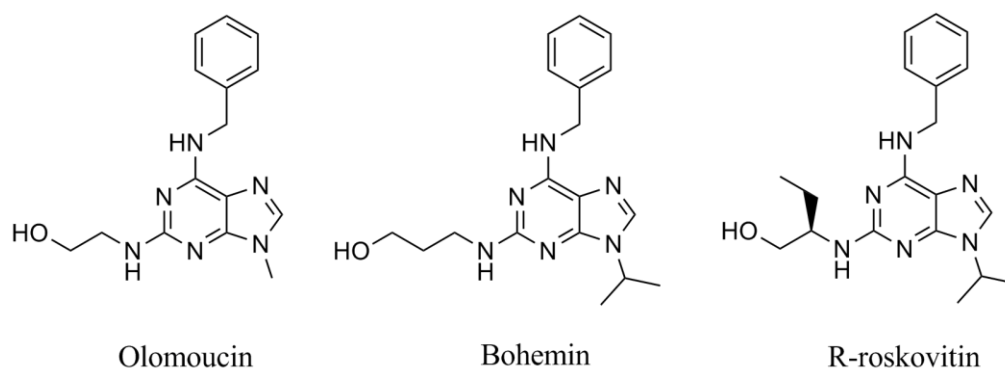
Obr. 2: Struktura flavopiridolu.

U purinových derivátů byla zkoumána jejich antiproliferační aktivita od doby, kdy bylo zjištěno, že N^6 -dimethyl-aminopurin inhibuje buněčné dělení inhibicí CDK2 v embryích mořského ježka (Neant *et Guerrier*, 1988; Meijer *et Pondaven*, 1989). Během testování nových potenciálních purinových inhibitorů byla objevena látka s vyšší specifitou, a to 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin (olomoucín; „Obr. 3“; Veselý *et al.*, 1994). Bylo zjištěno, že olomoucín přednostně inhibuje důležité kroky buněčného cyklu, *in vitro* aktivitu faktorů podporující M-fázi buněčného dělení a *in vitro* DNA syntézu u vajíček *Xenopus laevis* (Veselý *et al.*, 1994).

Po studiích olomoucínu byly připraveny další inhibitory bohemin a roscovitin („Obr. 3“; Havlíček *et al.*, 1997), které navozují inhibici buněčného cyklu a apoptózu v lidských nádorových buňkách. Mezi neprostudovanější 2,6,9-trisubstituované CDK inhibitory patří R-enantiomer roscovitinu - R-roskovitin (CYC202, Seliciclib). S-enantiomer roskovitinu má menší inhibiční aktivitu proti CDK2, proto se výzkum zabývá především R-enantiomerem (Havlíček *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). R-roskovitin patří mezi silné inhibitory lidské CDK2/cyklinu E, CDK1/cyklin B, CDK7/cyklinu H a CDK9/cyklinu T1 a CDK5 (Raynaud *et al.*, 2005). Snižuje fosforylaci Rb proteinu (Whittaker *et al.*, 2004) a inhibuje fosforylaci RNA polymerasy II a její proteinovou aktivitu, což má za následek sníženou expresi cyklinů D1,

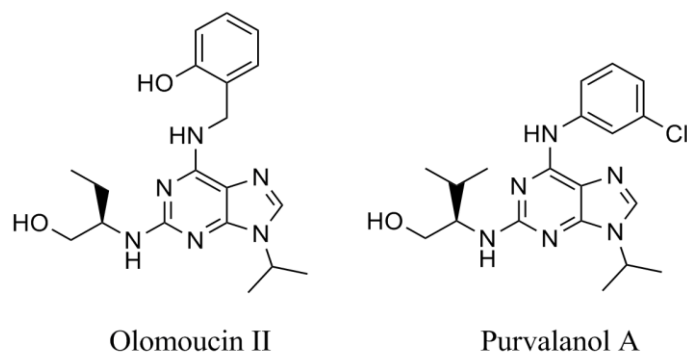
A a B1. Díky těmto vlastnostem dochází ke snížení podílu buněk v G1-fázi, snížené DNA syntéze v S-fázi a mírnému nárůstu buněk v G2 / M (Whittaker *et al.*, 2004; Raynaud *et al.*, 2005).

Porovnáním tří zmíněných trisubstituovaných aminopurinových CDK inhibitorů olomoucínu, boheminu a R-roskovitinu bylo zjištěno, že jako nejúčinnější inhibitor proti kinázám CDK2, CDK7, CDK9 je R-roskovitin (Raynaud *et al.*, 2005). Aktivita těchto tří látek ukazuje, že bohemin a R-roskovitin mají široké spektrum protinádorové aktivity a nezaměřují se na určitý typ nádorových buněk. Protinádorová účinnost těchto látek *in vitro* je v pořadí olomoucín ($IC_{50} = 56 \mu\text{mol} / \text{L}$) < bohemin ($IC_{50} = 27 \mu\text{mol} / \text{L}$) < R-roskovitin ($IC_{50} = 15 \mu\text{mol} / \text{L}$), což odpovídá jejich působení jako CDK inhibitorů. Tyto tři látky vyvolávají sníženou fosforylaci Rb a expresi cyklinu D1, nejméně však expresi cyklinu E. Důležité však je, že po 24 hodinové expozici dojde k 11-15% úbytku počtu buněk v S-fázi buněčného cyklu (Raynaud *et al.*, 2005).



Obr. 3: Strukturální vzorce vybraných 2,6,9-trisubstituovaných inhibitorů.

Na základě předchozích zkušeností byla připravena sloučenina purvalanol A („Obr. 4“) (Gray *et al.*, 1998) a olomoucín II - 6 - [(2-hydroxybenzyl) amino] - 2 - {[1 - (hydroxymethyl) propyl] amino} - 9 - isopropylpurin („Obr. 4“; Kryštof *et al.*, 2002). Účinnost Olomoucínu II byla stanovena na lidských proteinových kinázách a byla zjištěna specifita proti CDK7 a CDK9, což jsou kinázy uplatňující se v regulaci transkripce RNA (Kryštof *et al.*, 2005). Na základě těchto studií bylo zjištěno, že Olomoucín II je desetkrát silnějším inhibitorem nežli olomoucín a dvakrát silnější než R-roskovitin („Tab. 1“; Kryštof *et al.*, 2002).

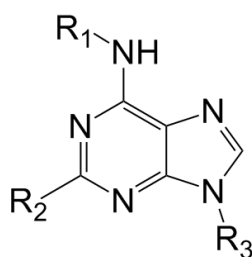


Obr. 4: Strukturní vzorec olomoucínu II a purvalanolu A.

Tab. 1: Inhibiční aktivita 2,6,9 – trisubstituovaných inhibitorů proti CDK1/cyklin B (podle Kryštof et al., 2002).

Látka	Substituent			IC ₅₀ (μM)
	C2	C6	N9	
Olomoucín	2-Hydroxyethylamino	benzylamino	methyl	7
Bohemín	3-Hydroxypropylamino	benzylamino	isopropyl	1,1
Roscovitin	[1-(Hydroxymethyl)propyl]amino	benzylamino	isopropyl	0,45
Olomoucín II	[1-(Hydroxymethyl)propyl]amino	2 - hydroxybenzylamino	isopropyl	0,02
Purvalanol A	[1-(Hydroxymethyl)-2-methylpropyl]amino	3 - chloroanilino	isopropyl	0,05

2.4.2 Vztah struktury a aktivity 2,6,9 – trisubstituovaných purinových derivátů (SAR)



R₁ = benzyl, substituovaný benzyl či fenyl

R₂ = hydroxyalkylamino či aminoalkylamino

R₃ = nižší alkyl (C1-C3)

Obr. 5: Základní struktura 2,6,9 – trisubstituovaných purinů.

Inhibiční aktivita je dána strukturou daného 2,6,9-trisubstituovaného CDK inhibitoru („Obr. 5“). Bylo zjištěno několik poznatků ohledně jejich vhodné struktury:

Pozice C2: V této pozici jsou možné hydrofobní interakce, ale i tvorba vodíkových můstků (prostřednictvím OH-skupiny) (Fischer et al., 2000). Velmi vhodnými substituenty jsou aminoalkoholy (odvozené od α-aminokyselin - především valin a isoleucin) a aminoalkylaminy s nejméně čtyřmi uhlíkovými atomy (Chang et al., 1999). Odstraněním 2-hydroxyethylamino

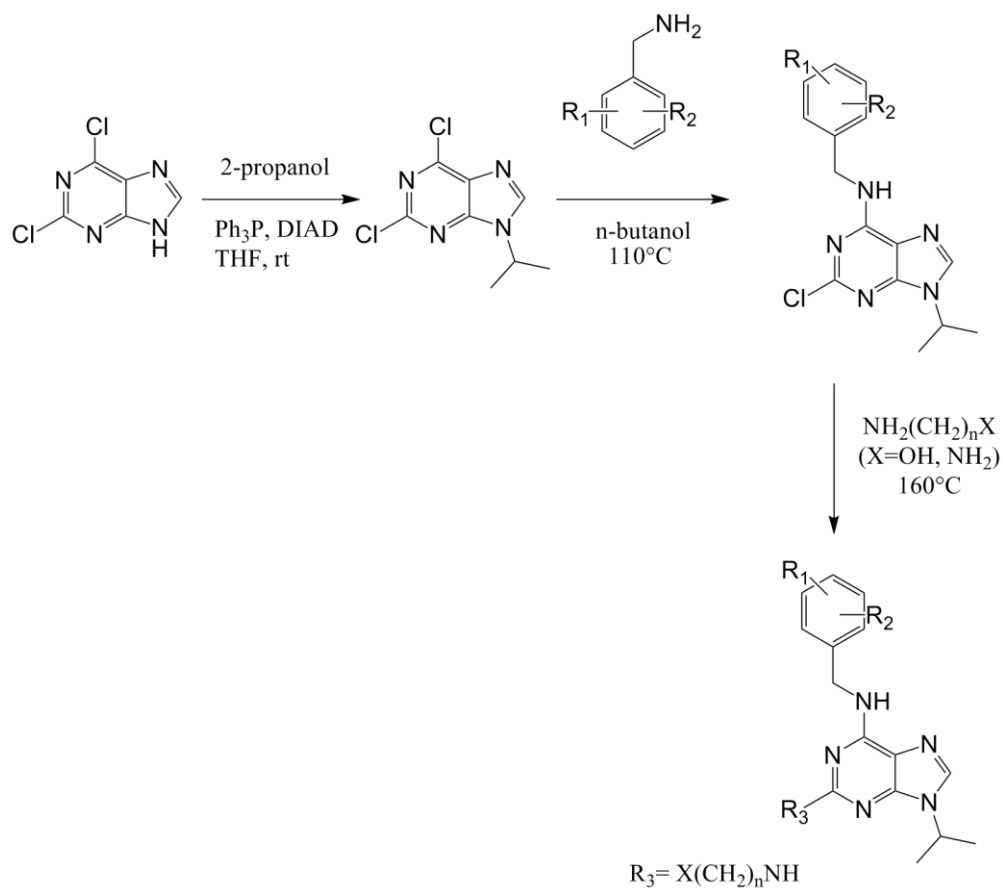
skupiny v poloze C2 se výrazně sníží inhibiční efekt. Snížení inhibiční aktivity způsobí i přítomnost atomu chloru či amino skupiny v této poloze (Veselý *et al.*, 1994).

Pozice C6: V této pozici jsou častými substituenty hydrofobní zbytky jako benzyly, hydroxybenzyly, isopentenyl (Veselý *et al.*, 1994). Na základě strukturních analýz bylo zjištěno, že benzyly v této poloze dávají této rodině inhibitorů typické inhibiční vlastnosti, jelikož interaguje s aminokyselinovými zbytky, které neinteragují s ATP (Legraverend *et al.*, 1999). Odstranění benzylu v C6 pozici tedy vede k dramatickému poklesu inhibiční aktivity až na úroveň neúčinné molekuly. Inhibiční aktivita je přibližně stejná po substituci benzylem nebo 3-hydroxybenzylem, avšak po substituci isopentenylem se inhibice sníží (Veselý *et al.*, 1994). Inhibiční aktivita se také mění s přidáním substituentů na benzyly. Inhibiční aktivita se zvýší po substituci hydroxylové skupiny do polohy *ortho* (Kryštof *et al.*, 2002). Dále substituce v poloze *meta* na benzylu objemnější lipofilní skupinou (chlór, bróm, jód) způsobí také zvýšení inhibiční aktivity (Legraverend *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2000).

Pozice N9: Opět je zde důležitá přítomnost hydrofobních alifatických či alicyklických zbytků (C1-C5; Veselý *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2000). Odstranění alkylové skupiny v C9 poloze výrazně snižuje inhibiční aktivitu. Po výměně methylové skupiny (olomouciny) za isopropylovou skupinu v C9 pozici dojde ke zvýšení aktivity (olomouciny II), proto se substituce isopropylem jeví jako velmi vhodná. Přítomnost sacharidu v této poloze je nežádoucí, jelikož zruší inhibiční aktivitu (Veselý *et al.*, 1994).

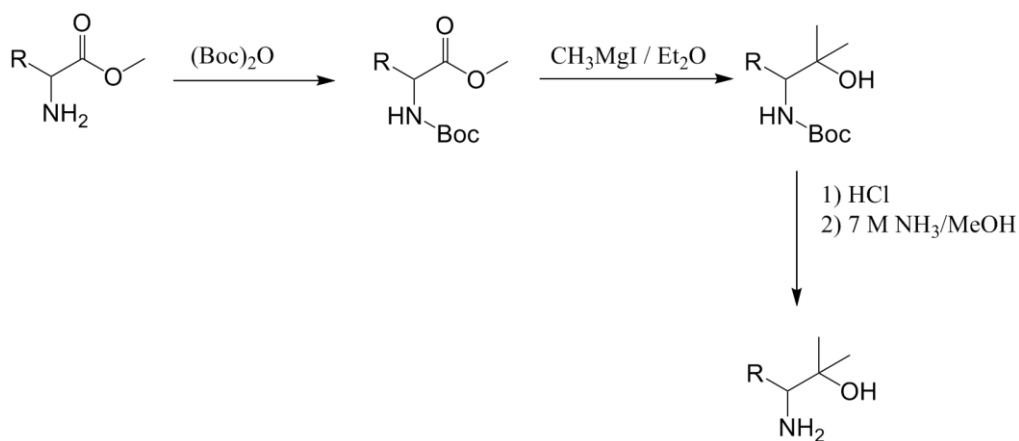
2.4.3 Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu

Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů zahrnuje tři hlavní kroky přípravy („Obr.6“). První krok vychází z komerčně dostupného 2,6-dichlorpurinu, který prostřednictvím Mitsunobu alkylace reaguje s isopropyl alkoholem za vzniku 2,6-dichlor-9-isopropylpurinu (Weibing *et al.*, 2007). Ve druhém kroku takto vzniklý meziprodukt reaguje s vhodně substituovaným benzylaminem, kdy dochází k substituci v pozici C6 (Imbach *et al.*, 1999). Ve třetím kroku reakcí s aminoalkoholem vzniká konečný 2,6,9 – trisubstituovaný derivát purinu (Legraverend *et al.*, 1999; Imbach *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2009).



Obr. 6: Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu.

Syntéza prekurzorů C2 purinové substituce zahrnuje tři základní kroky, a to protekci aminoskupiny esteru aminokyseliny, reakci s Grignardovým činidlem a následně deprotekcí aminoskupiny („Obr.7“). Při protekci reaguje daný ester aminokyseliny a di-tert. butyl bikarbonát za vzniku N-Boc-amino-methylesteru. Následná reakce s Grignardovým činidlem zahrnuje přípravu Grignardového činidla (CH₃MgI) a dále reakci Grignardového činidla s Boc-amino-methylesterem za vzniku N-Boc-aminoalkoholu. V posledním kroku přípravy prekurzorů dochází k deprotekcí Boc-aminoalkoholu (Gibson *et al.*, 2005).



Obr. 7 : Syntéza prekurzorů pro C2 substituci.

2.4.4 Metabolismus 2,6,9- trisubstituovaných derivátů purinu

Aby bylo možné potenciální užití olomoucínu, bohemínu a R-roskovitinu při léčbě nádorových onemocnění, je nutné, abychom znali jejich metabolismus, popřípadě jejich toxicitu pro lidské tělo (Mcclue *et al.*, 2008). Metabolismus trisubstituovaných purinových derivátů byl studován *in vitro* a byly určeny cesty primárního metabolismu a glukuronidace (Chmela *et al.*, 2001; Rypka *et al.*, 2002; Červenková *et al.*, 2003).

Jedním z důležitých poznatků je, že alifatický hydroxylový řetězec olomoucínu, bohemínu a R-roskovitinu v C2 pozici je citlivý k hlavním metabolickým reakcím (konjugační reakce, oxidační reakce). Řetězec je glukosylován nebo glukuronidován UDP glukózou či UDP-glukuronovou kyselinou. Pořadí citlivosti glukosidace a glukuronidace v myších mikrosomech je bohemín >> R-roskovitin > olomoucín (Červenková *et al.*, 2003).

Bohemín

Bohemín byl úplně metabolizován *in vivo* a z oběhu prakticky zmizel během 60 min po intravenózním podání. Byly identifikovány tři hlavní metabolity bohemínu: M1 (bohemín β -glukuronid), M2 (bohemín β -glukosid) a M3 (bohemín karboxylová kyselina). Metabolity byly částečně odbourávány v hepatobiliárním traktu a v ledvinách. Metabolit M3, který tvoří hlavní část metabolitů obsažených v krvi či játrech a převládající v těle myši i po době pozorování, byla karboxylová kyselina - 6-benzylamino-2-(2-karboxyethylamino)-9-isopropylpurin. Tento metabolit je z hlediska inhibice CDK téměř inaktivní. V ledvinách, střevě, močovém měchýři převládal metabolit M2. Malé množství bohemínu bylo zjištěno i v proximálním střevě, v močovém měchýři nikoliv (Chmela *et al.*, 2001).

Bohemín O- β -D-glukosid (M2) byl nejvíce se vylučujícím metabolitem. Enzymatický mechanismus zodpovědný za glukosidaci bohemínu vyžaduje přítomnost UDP-glukosidového donoru. Proto další glukosidační produkty byly pozorovány po přidání UDP-glukoronidu, UDP-xylázy, UDP-galaktosy nebo UDP-N-acetylglukosaminu (Chmela *et al.*, 2001).

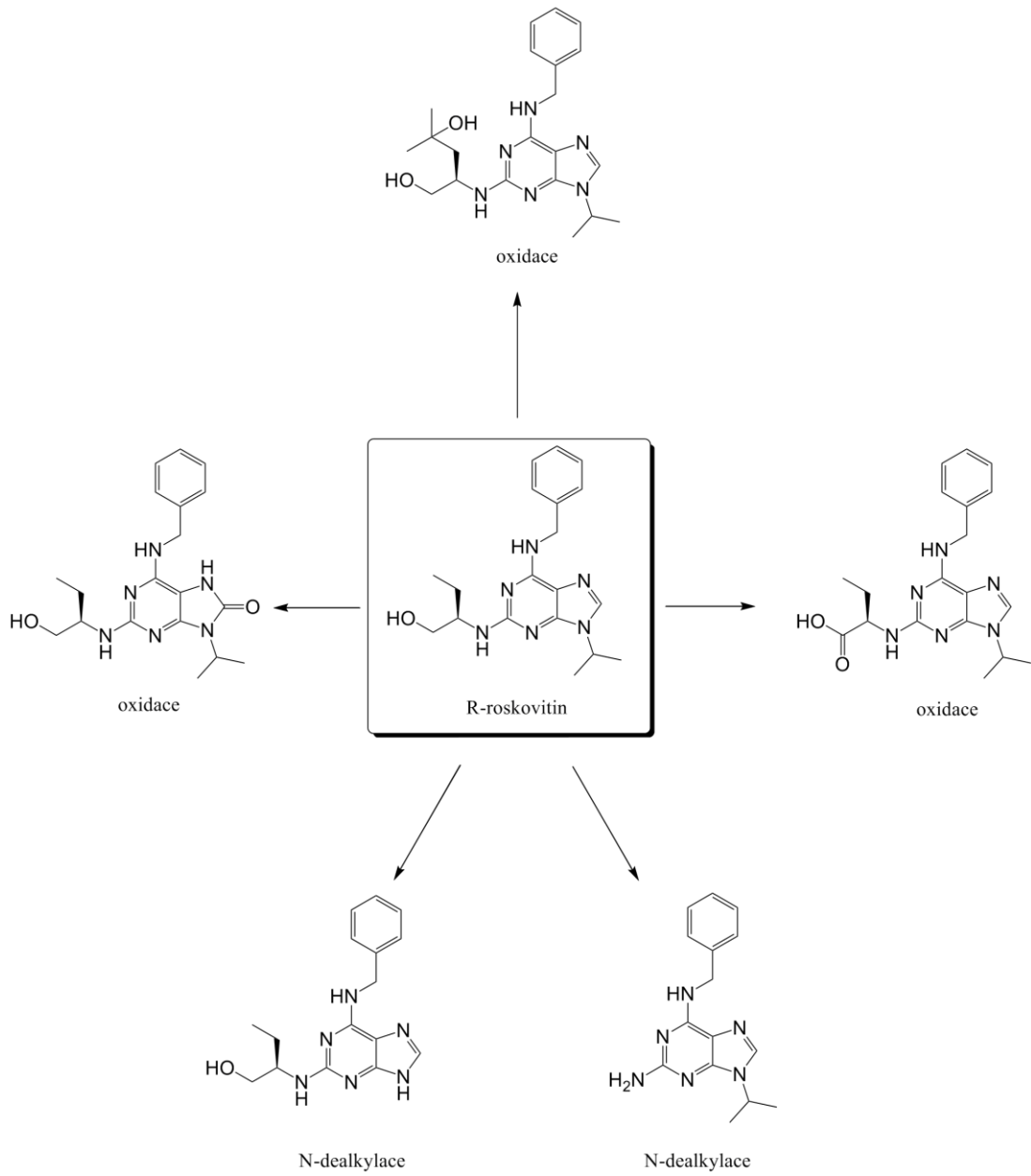
Významnou funkci v metabolismu bohemínu hraje systém $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$. Základní reakce NADP^+ s bohemínem je oxidace (M3), hydroxylace (M6), dva typy dealkylace (M4 a M8) a debenzylace (M5; Rypka *et al.*, 2002). Dále bylo prokázáno, že NAD^+ dependentní alkoholdehydrogenasa I katalyzuje transformaci bohemínu v kyselinu (Chmela *et al.*, 2001). Nejen alkohol dehydrogenasa (Chmela *et al.*, 2001), ale i jaterní mikrosomy obohacené o NADPH mohou produkovat tuto karboxylovou kyselinu bohemínu (M3; Rypka *et al.*, 2002).

R-Roskovitin (CYC202)

Metabolismus R-roskovitinu je primárně mikrosomální, je inhibován v přítomnosti inhibitoru CYP SKF-525A a je závislý na NADPH (Nutley *et al.*, 2005). Proto byl R-roskovitinu inkubován s mikrosomy (od různých živočišných druhů) po dobu 60 min (McClue *et Stuart*, 2008). Po této době bylo 86,7 % R-roskovitinu metabolizováno, z čehož 60 % tvoří jeden hlavní metabolit. Tento metabolit je karboxylová kyselina, která vznikla oxidací hydroxylové skupiny aminoalkoholu v C2 pozici purinového skeletu („Obr. 8“; Nutley *et al.*, 2005; McClue *et Stuart*, 2008). Tento produkt je nejvíce se vylučujícím metabolitem v moči hlodavců a je opět prakticky neúčinný z hlediska CDK inhibice, resp. protinádorové aktivity (Nutley *et al.*, 2005).

Důležitou roli v metabolismu R-roskovitinu hraje cytochrom CYP3A4 (McClue *et Stuart*, 2008). Transformace R-roskovitinu na karboxylovou kyselinu je zprostředkována pomocí cytochromu P450 CYP3A4 a CYP2B6 a je závislá na NADPH. Cytochrom CYP3A4 je zodpovědný za metabolismus nejen R-roskovitinu, ale i mnoha xenobiotik (léky pro léčbu rakoviny, antibiotika), proto je důležitá znalost jeho interakce s dalšími léky podávané společně s R-roskovitinem (Guengerich, 1999). Mezi další cytochrom patří CYP2B6, který je zodpovědný za 2-4 % metabolismu R-roskovitinu. Tento cytochrom metabolizuje i protinádorová léčiva jako je cykloposfamid a ifosfamid (Code *et al.*, 1997).

Mezi další metabolické cesty patří oxidativní N-dealkylace. Bylo zjištěno, že isopropylová skupina u R-roskovitinu je citlivá na N-dealkylaci. Tento metabolit ale tvoří minoritní složku z celkového množství metabolitů (2,6 %). Dále dochází k oxidaci v pozici C8 na purinovém kruhu. Tato reakce je zprostředkována několika enzymatickými systémy zahrnující xantin oxidázu, aldehyd oxidázu a CYP oxidázu. Taktéž C8-oxo-R-roskovitin patří mezi minoritní složku z celkového množství metabolitů (4,9 %; „Obr. 8“; Nutley *et al.*, 2005).



Obr. 8: Metabolismus R-roskovitinu.

3 MATERIÁL

3.1 Analytické metody

Body tání nových připravených látek byly zjištěny na bodotávku (B-540 Buchi Melting Point Apparatus, 120V - Buchi®). Čistota meziproductů a produktů byla sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 WF₂₅₄ (Merck). Spektra nukleární magnetické rezonance (¹H NMR) byla získána na Bruker Avance AV 300 spektrometru při frekvenci 300 MHz. Látky byly rozpuštěné v DMSO-d₆ nebo chloroformu. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách.

HPLC čistota byla provedena na RP-sloupci (150 mm '4.6 mm, 5mm, Microsorb C18, Varian). Vzorokly byly rozpuštěny v mobilní fázi, nanoseny na kolonu a oddělené složky byly vymyty lineárním methanolickým gradientem při průtoku 0,6 ml / min. Vyvíjecí sloučeniny byly detekovány pomocí skenování UV absorbance eluátu mezi 240 a 300 nm.

3.2 Použité chemikálie

Během přípravy několika nových CDK inhibitorů byly použity tyto chemikálie: hydrochlorid glycin methylester, hydrochlorid alanin methylester, di-tert. butyl bikarbonát (Boc₂O), hořčík prášek, suchý diethylether, jód, N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) od firmy Sigma Aldrich; methyljodid od firmy Fluka; triethylamin, metanol, diethylether, ethylacetát, chloroform, isopropanol, petrolether od firmy Lach-ner; N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) od firmy Riedel de Haen; 2,6-dichlor-9-isopropylpurin (DCIP), 2-hydroxybenzylamin a 5-chlor-2-hydroxybenzylamin byly připraveny Laboratoří růstových regulátorů v Olomouci.

3.3 Použité pufrý pro kinázový test

Při provedení kinázového inhibičního testu byly použity tyto pufrý: 2x kinázový pufr pro kinázový inhibiční test: 100 mM Hepes (pH = 7,4), 20 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 20 mM 2-glycerolfosfát, 2 mM NaF (pH = 7,4); 2x reakční pufr pro kinázový inhibiční test: 2x kinázový pufr, 30 μM ATP, [γ-33P]ATP.

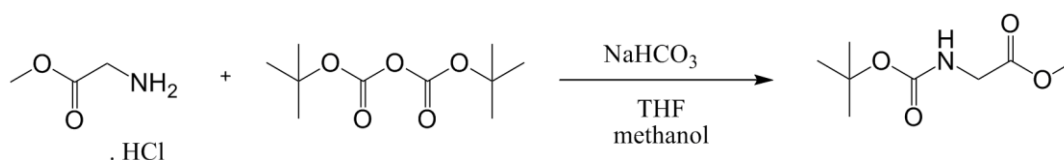
4 METODIKA

4.1 Příprava prekurzorů pro C2 substituci

4.1.1 1,1-dimethylglycinol

Příprava N-Boc-glycin methylesteru

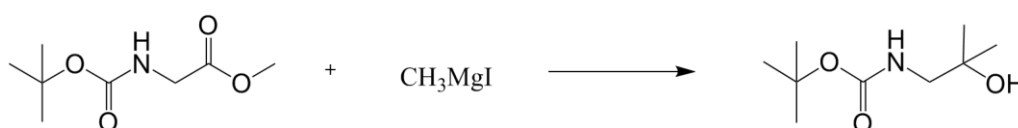
K 7,12 g (0,057 mol) hydrochloridu glycin methylesteru ve směsi THF (120 ml) – methanol (30 ml) bylo přidáno 14,4 g (0,17 mol) suchého hydrogenuhličitanu sodného při teplotě 0°C. Poté 12,4 g (0,057 mol) di-tert. butyl bikarbonátu (Boc₂O) a směs byla míchána po 20 hodin za laboratorní teploty. Poté byla směs zředěna 100ml destilovanou vodou a byla provedena extrakce etherem (3x 50 ml). Spojené extrakty byly vytřepány 10 ml 5% hydrogenuhličitanu sodného a bylo provedeno vysušení bezvodým síranem hořečnatým (5 g). Směs byla zahuštěna na RVO za vzniku žlutého olejovitého odparku.



Obr. 9: Schéma reakce přípravy N-Boc-glycin methylesteru.

Příprava methylmagnesium jodidu a jeho reakce s N-Boc-glycin methylesterem

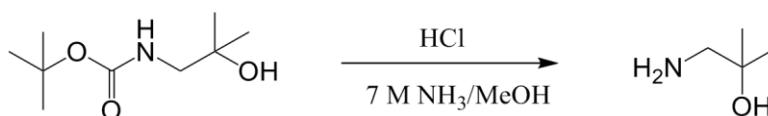
Do tříhrdlé baňky bylo vloženo 3,99 g (0,164 mol) hořčíku a 36 ml abs. diethyletheru a zrno jódu pro aktivaci hořčíku. Po zahájení reakce bylo přikapáno 10,1 ml (0,163 mol) methyljodidu v etheru (18,04 ml) a směs byla přivedena k refluxu a míchána po dobu 40 minut. Poté bylo Grignardovo činidlo ochlazeno na 5°C a byl přikapán roztok 7,7 g (0,04 mol) Boc-glycin methylesteru v 36 ml diethyletheru, tak aby teplota nepřesáhla 20°C. Směs byla míchána po 12 hodin. Poté byla směs ochlazena ledovou lázní na 5°C a bylo přidáno 182 ml nasyceného roztoku chloridu amonného. Etherová fáze byla uschována a vodná fáze třikrát byla extrahována etherem (140 ml). Etherové extrakty byly třikrát protřepány destilovanou vodou (60 ml), jedenkrát thiosíranem sodným (110 ml), jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného (10 ml) a poté vysušeny bezvodým síranem sodným a směs byla odpařena na RVO na žlutooranžový medovitý odparek.



Obr. 10: Schéma reakce přípravy Boc-1,1-dimethylglycinolu.

Deprotekce N- Boc -1,1-dimethylglycinolu

5,6 g (0,029 mol) Boc-1,1-dimethylglycinolu bylo rozpuštěno v 74 ml ethylacetátu a k roztoku bylo přidáno 3 M HCl (74 ml). Dvoufázová reakční směs byla míchána 16 hodin za laboratorní teploty. Poté byla směs zahuštěna na RVO na medovitý odparek, který byl rozpuštěn v 7 ml ethylacetátu. Vzniklý roztok byl zneutralizován 4,2 ml 7 M methanolickým amoniakem, tak aby výsledné pH bylo alkalické. Vyloučený chlorid amonný byl odfiltrován, promyt malým množstvím ethylacetátu a filtrát byl zahuštěn na RVO na medovitý odparek, který představoval surový produkt. Kontrola byla provedena pomocí TLC, kde mobilní fáze byla chloroform-methanol (4 : 1), detekce byla provedena ninhydrinem.

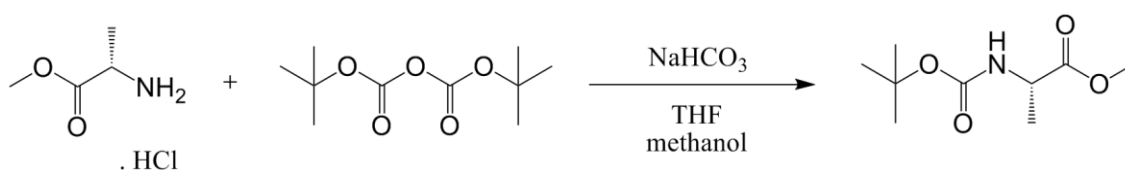


Obr. 11: Schéma deprotekce Boc-1,1-dimethylglycinolu.

4.1.2 1,1-Dimethyl-L-alaninol

Příprava N-Boc-L-alanin methylesteru

K 7,91 g (0,056 mol) hydrochloridu L-alanin methylesteru ve směsi THF (133 ml) – methanol (33 ml) bylo přidáno 16 g (0,18 mol) suchého hydrogenuhličitanu sodného při teplotě 0°C. Poté bylo přidáno 13,8 g (0,056 mol) di-tert. butyl bikarbonátu (Boc₂O) a směs byla míchána po 20 hodin za laboratorní teploty. Poté byla směs zředěna 110 ml destilovanou vodou a byla provedena extrakce etherem (3x – 500 ml). Spojené extrakty byly vytřepány 5% hydrogenuhličitanem sodným (200 ml) a bylo provedeno vysušení bezvodým síranem hořečnatým. Směs byla zahuštěna na RVO za vzniku žlutého olejovitého odparku.

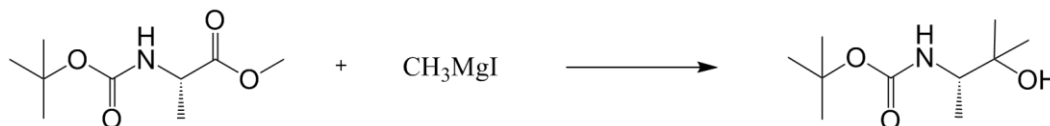


Obr. 12: Schéma reakce přípravy N-Boc-L-alanin methylesteru.

Příprava methylmagnesium jodidu a jeho reakce s N-Boc-L-alanin methylesterem

Bylo připraveno Grignardovo činidlo dle postupu přípravy methylmagnesium jodidu, kdy bylo použito 4,28 g (0,176 mol) hořčíku se 39 ml abs. diethyletherem a 10,86 ml (0,175 mol) methyljodidu v etheru. Po ochlazení Grignardova činidla byl přikapán roztok Boc-glycin methylesteru v 39 ml diethyletheru, tak aby teplota nepřesáhla 20°C. Směs byla míchána po 12 hodin. Poté byla směs ochlazená ledovou lázní na 5°C a bylo přidáno 190 ml nasyceného

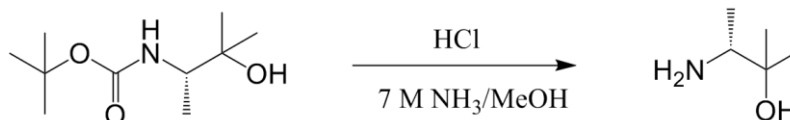
roztoku chloridu amonného. Etherová fáze byla uschována a vodná fáze byla třikrát extrahována etherem (150 ml). Etherové extrakty byly třikrát protřepány destilovanou vodou (120 ml), jedenkrát thiosíranem sodným (10 ml), jedenkrát nasyceným roztokem chloridu sodného (10 ml) a poté vysušily bezvodým síranem sodným a směs byla odpařena na RVO.



Obr. 13: Schéma reakce přípravy Boc-1,1-dimethyl-L-alaninolu.

Deprotekce N- Boc -1,1-dimethyl-L-alaninolu

6,97 g (0,034 mol) Boc-1,1-dimethyl-L-alaninolu bylo rozpuštěno v 85 ml ethylacetátu a k roztoku se přidal 3 M HCl (85 ml). Dvoufázová reakční směs byla míchána 16 hodin za laboratorní teploty. Poté byla zahuštěna na RVO na medovitý odparek, který byl rozpuštěn v 10 ml ethylacetátu. Vzniklý roztok byl zneutralizován 4,86 ml 7 M methanolickým amoniakem, tak aby výsledné pH bylo alkalické. Vyloučený chlorid amonný byl odfiltrován, promyt malým množstvím ethylacetátu a filtrát byl zahuštěn na RVO na medovitý odparek, který představoval surový produkt. Kontrola byla provedena pomocí TLC, kde mobilní fáze byla chloroform:metanol, 4 : 1; detekce byla provedena ninhydrinem.

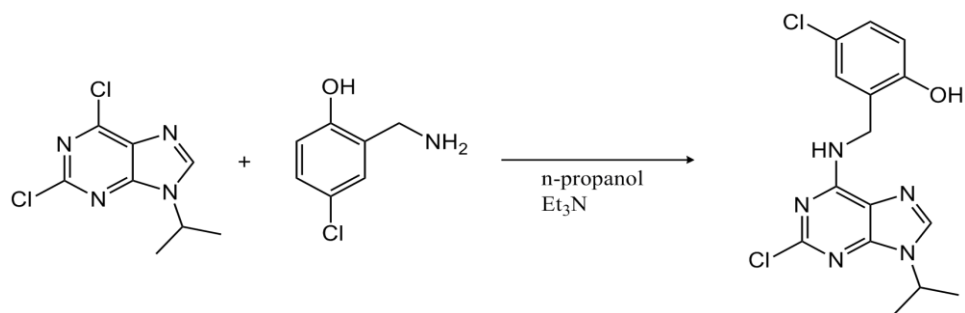


Obr. 14: Deprotekce Boc-1,1-dimethyl-L-alaninolu.

4.2 Příprava purinového prekurzoru

4.2.1 Příprava 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurinu

Do baňky (50 ml) bylo předloženo 2,31 g (0,01 mol) 2,6-dichlor-9-isopropylpurinu (DCIP), 1,58 g (0,01 mol) 2-aminomethyl-4-chlorfenolu a 4,5 ml (0,03 mol) triethylaminu. Reakční směs byla vyhřátá pomocí olejové lázně k reflexu (95 – 98°C) a míchána 4 hodiny. Poté byla ochlazená na laboratorní teplotu a zahuštěna na RVO na odparek, který byl zpracován s vodou (40 ml). Vyloučená pevná fáze byla odfiltrována a promyta vodou (3 x 5 ml) a vysušena do konstantní hmotnosti. Surový produkt byl krystalován z isopropanolu (25 ml). Z matečných louhů se po odpaření na RVO a zpracování s etherem (30 ml) získal druhý podíl o nižší čistotě (90 %).

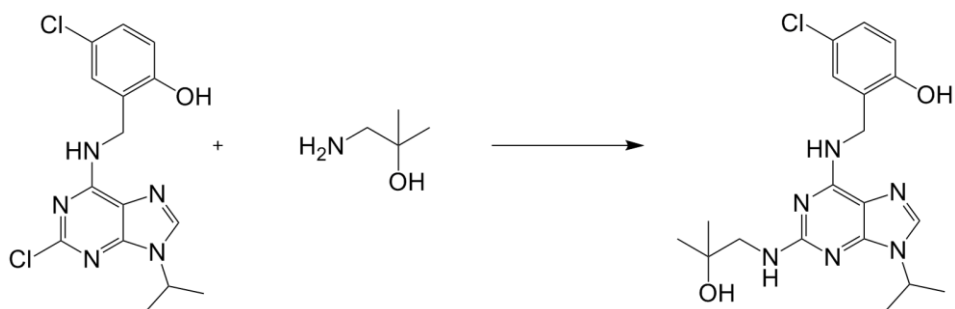


Obr. 15: Schéma reakce přípravy 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurinu.

4.3 Příprava nových 2,6,9 – trisubstituovaných derivátů purinu

4.3.1 4-chlor-2- {[2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino] – methyl} –fenol (látka 1)

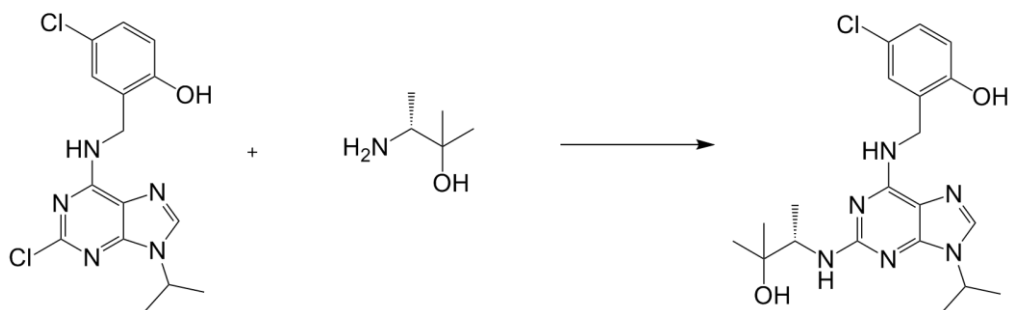
Do skleněné tlakové ampule s uzávěrem o 35 ml do 2/3 jejího objemu bylo umístěno 0,55 g ($1,56 \cdot 10^{-3}$ mol) 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurinu, 0,785 g ($8,8 \cdot 10^{-3}$ mol) 1,1-dimethylglycinolu, 9,9 ml NMP a 2,75 ml DIPEA. Ampule propláchnuta argonem byla vložena do rozehřátého oleje na 160°C a během míchání byla směs zahřívána 24 hodin. Poté bylo přidáno 100 ml vody a 100 ml ethylacetátu. Po vytřepání byla uschována organická fáze a vodná byla znovu vytřepána s ethylacetátem. Organické fáze byly promyty vodou (30 ml) a vysušeny bezvodým síranem hořečnatým. Směs byla odpařena do sucha na RVO. K odparku bylo přidáno 75 ml diethyletheru a produkt později vykrytalizoval až po odpaření diethyletheru. Bylo nutné přečištění na koloně o 130 g silikagelu (mobilní fáze: chloroform : methanol, 9 : 1) vzhledem k tomu, že ve směsi zůstalo značné množství nezreagované výchozí látky. Po odpaření na RVO byl produkt zpracován s cyklohexanem a poté byl odsát na fritě a promyt cyklohexanem. Produkt byl dále rozpuštěn v 5 ml ethylacetátu za horka. Poté bylo přidáno 10 ml horkého petroletheru. Produkt byl krystalován za laboratorní teploty, zfiltrován a vysušen do sucha. Čistota byla kontrolována pomocí TLC (chloroform : methanol, 85 : 15) a následného změření NMR a HPLC.



Obr. 16: Příprava 2,6,9-trisubstituovaného derivátu purinu odvozeného od glycinu.

4.3.2 4-chlor-2- {[2-((S)-2-hydroxy-1,2-dimethyl-propylamino)-9-isopropyl-9H -purin-6-ylamino] -methyl} -fenol (látka 2)

Do skleněné tlakové ampule s uzávěrem o 35 ml do 2/3 jejího objemu bylo umístěno 0,82 g ($2,34 \cdot 10^{-3}$ mol) 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurinu, 1,69 g (0,016 mol) 1,1-dimethyl-L-alaninu, 13,4 ml NMP a 4,1 ml DIPEA. Ampule propláchnuta argonem byla vložena do rozehřátého oleje na 160°C a během míchání byla směs zahřívána 24 hodin. Poté bylo přidáno 120ml vody a 150 ml ethylacetátu. Po vytřepání byla uschována organická fáze a vodná byla znovu vytřepána s ethylacetátem. Organické fáze byly promyty vodou (30 ml) a vysušeny bezvodým síranem hořečnatým. Směs byla odpařena do sucha na RVO. K odparku bylo přidáno 75 ml diethyletheru a produkt později vykrytalizoval až po odpaření diethyletheru. Bylo nutné přečištění na koloně o 130 g silikagelu (mobilní fáze: ethylacetát : petrolether, 2 : 1) vzhledem k tomu, že ve směsi zůstalo poměrně mnoho nezreagované výchozí látky. Po odpaření na RVO byl produkt zpracován s diethyletherem a poté opět do sucha odpařen na RVO. Čistota byla kontrolována pomocí TLC (chloroform : methanol, 85 : 15) a následného změření NMR a HPLC.



Obr. 17: Příprava 2,6,9-trisubstituovaného derivátu purinu odvozeného od alaninu.

4.4 Testování připravených CDK inhibitorů

4.4.1 Kinázový inhibiční test

Reakce byla prováděna v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce s kulatým dnem. Testované látky byly naředěny 5 mM HCl a destilovanou vodou na požadovanou koncentraci 10 mM. Do jamek, začínající jamkou B2, bylo napipetováno 2 μ l testované látky, 1 μ l roztoku histonu, 1 μ l enzymu CDK2/cyklin E a 1 μ l destilované vody. Reakce se poté nastartovala přidáním 5 μ l 2x reakčního pufru a destička se nechala inkubovat 40 minut při 30°C za mírného třepání. Po inkubaci se reakce zastavila přidáním 5 μ l 3% kyseliny fosforečné. Po protřepání se z každé jamky odebralo 5 μ l na fosfocelulosový papír P-81 o potřebné velikosti s předem připravenou mřížkou. Po zaschnutí (5 minut) se destička 3x promyla 200 ml promývacím roztokem kyseliny fosforečné. Poté se fosfocelulosový papír opláchl 96% etanolem a po zaschnutí byl zabalen do potravinové fólie. Fosfocelulosový papír byl exponován přes noc v kazetě s citlivou deskou. Druhého dne byl papír oskenován pomocí Image Readeru BAS-1800 a bylo provedeno vyhodnocení závislosti kinázové aktivity na koncentraci v programu OriginPro 8.5.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava prekurzorů pro C2 substituci

5.1.1 1,1-dimethylglycinol

N-Boc-glycin methylester

Výtěžek: 7,95 g (74 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.43 (s, 9H), 3.73 (s, 3H), 3.89 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 5.09 (bs, 1H).

N- Boc -1,1-dimethylglycinol

Výtěžek: 5,6 g (73 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.22 (s, 6H), 1.46 (s, 9H), 3.12 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.95 (bs, 1H).

1,1-dimethylglycinol

Výtěžek: 2,15 g (82 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.17 (s, 6H), 2.33 (bs, 3H), 2.63 (s, 2H).

5.1.2 1,1-dimethyl-L-alaninol

N-Boc-L-alanin methylester

Výtěžek: 9,1 g (79 %).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 1.21 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 3.61 (s, 3H), 4.01 (p, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H).

N- Boc -1,1-dimethyl- L-alaninol

Výtěžek: 6,97 g (78 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 2.47 (bs, 1H), 3.58 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.76 (bs, 1H).

1,1-dimethyl-L-alaninol

Výtěžek: 1,75 g (50 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.12 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 2.89 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.31 (bs, 3H).

5.2 Příprava purinového prekurzoru

5.2.1 2-chlor-6-(2-hydroxy-5-chloro-benzylamino)-9-isopropylpurin

Výtěžek: 1,94 g (54,5 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.49 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 4.55 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 4.67 (hept, J = 6.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.64 (bs, 1H), 9.95 (s, 1H).

5.3 Příprava nových 2,6,9 – trisubstituovaných derivátů purinu

5.3.1 4-chlor-2- {[2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino] – methyl} –fenol (látka 1)

Výtěžek: 370 mg (57,86 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.30 (s, 6H), 1.53 (d, J = 6.7 Hz, 6H), 1.86 (bs, 2H), 3.47 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 4.52 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 4.59 (h, J = 7.0 Hz, 1H), 5.18 (bs, 1H), 5.37 (bt, J = 4.0 Hz, 1H), 6.83 – 6.87 (m, 2H), 7.15 – 7.16 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 11.56 (bs, 1H). („Příloha č. 1“)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 22.6, 27.6, 41.0, 46.9, 53.7, 71.8, 114.5, 119.6, 124.3, 126.9, 129.7, 130.6, 135.4, 150.1, 154.2, 154.8, 159.3. („Příloha č. 2“)

Čistota HPLC-MS: 99,3 %.

Bod tání: 183 - 186 °C.

5.3.2 4-chlor-2- {[2-((S)-2-hydroxy-1,2-dimethyl-propylamino)-9-isopropyl-9H -purin-6-ylamino] –methyl} –fenol („látka 2)

Výtěžek: 460 mg (47,18 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.25 – 1.31 (m, 9H), 1.53 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 4.02 (p, J = 7 H, 1H), 4.50 – 4.55 (m, 2H), 4.59 (h, J = 6.9 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.99 (bs, 1H), 7.13 – 7.15 (m, 2H), 7.52 (s, 1H). („Příloha č. 3“)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 17.0, 22.5, 24.5, 28.3, 40.9, 46.9, 56.7, 74.1, 114.2, 119.4, 124.2, 126.9, 129.5, 130.6, 135.2, 150.1, 154.2, 154.8, 158.7. („Příloha č. 4“)

Čistota HPLC-MS: >99 %.

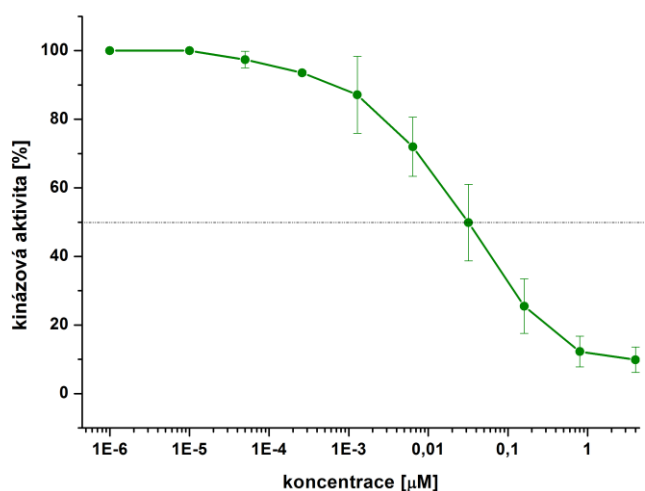
Bod tání: 67 – 71°C.

5.4 Testování připravených CDK inhibitorů

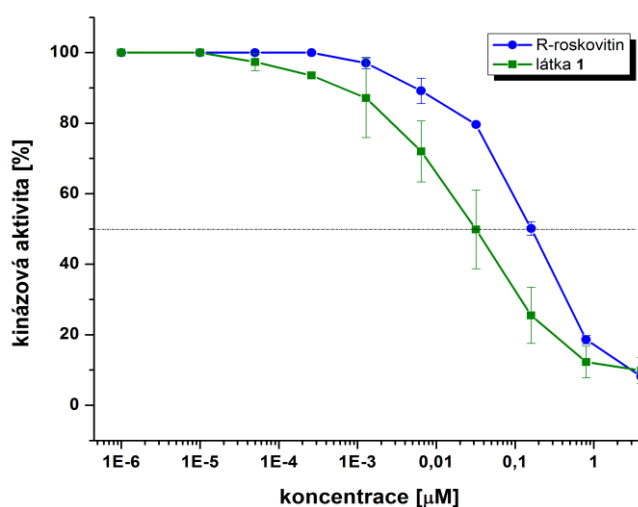
5.4.1 Kinázový inhibiční test

Na základě tohoto testu byly určeny hodnoty IC_{50} pro látky **1** a **2**. IC_{50} vyjadřuje koncentraci inhibitoru, při které je aktivita daného enzymu 50%. Tyto hodnoty jsou srovnány s dalšími 2,6,9-trisubstituovanými inhibitory.

Výsledky ukazují, že obě látky **1** a **2** jsou účinnými inhibitory CDK2/cyklin E. Hodnota IC_{50} u látky **1** byla $0,033 \mu\text{M}$ („Obr. 18“) a u látky **2** $0,051 \mu\text{M}$.



Obr. 18: Graf závislosti kinázové aktivity CDK2/cyklin E na koncentraci testované látky **1**, kde IC_{50} je $0,033 \mu\text{M}$.



Obr. 19 : Srovnání kinázového inhibičního testu na CDK2/cyklin E R-roskovitinu ($IC_{50} = 0,162 \mu\text{M}$) a látky **1** ($IC_{50} = 0,033 \mu\text{M}$).

5.4.2 Cytotoxicita

Cytotoxicita látek **1** a **2** byla provedena na několika vybraných liniích a bylo určeno IC_{50} pro každou z nich. Opět byla prokázána jejich vysoká účinnost. Hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce č.2.

Tab. 2: Hodnoty IC_{50} (μM) látek **1** a **2** pro různé nádorové linie.

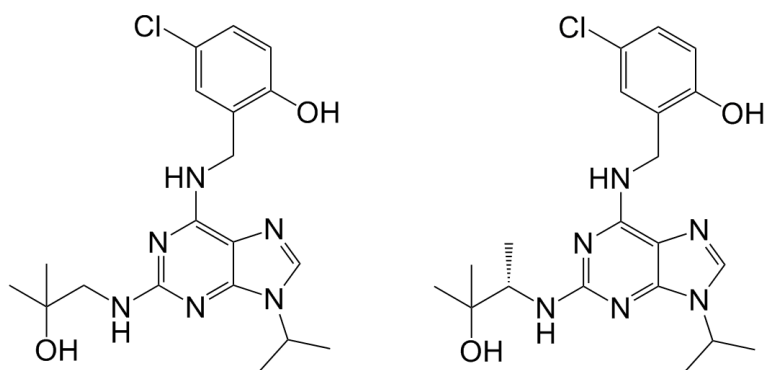
Látka	Inhibice růstu různých nádorových buněčných linií IC_{50} (μM)						
	K562	MCF7	G361	HOS	HELA	HCT116	CELA
	myeloidní leukemie	karcinom prsu	kožní melanom	osteosarkom	cervikální karcinom	kolorektální adenokarcinom	lymfoidní leukemie
1	5,08	2,73	4,25	4,36	6,84	4,03	3,91
2	1,95	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	1,82	n.d.

6 DISKUSE

Cílem této bakalářské práce byla příprava dvou nových CDK inhibitorů odvozené od struktury roskovitinu. Tyto nově syntetizované inhibitory CDK se vyznačují přítomností dvou methylových skupin na uhlíku řetězce v poloze C2 purinu, původně nesoucí primární hydroxylovou skupinu („Obr.20“). Tato transformace by měla zajistit vysokou stabilitu takto vzniklého terciárního hydroxyly vůči oxidaci a dalším reakcím (glukuronidace, glukosylace; Červenková *et al.*, 2003).

Tyto nově syntetizované trisubstituované puriny byly testovány pomocí kinázového inhibičního testu na CDK2/cyklin E. Obě látky prokázaly vysokou inhibiční schopnost, kde látka **1** má hodnotu IC_{50} 0,033 μ M a látka **2** 0,051 μ M. Je zřejmé, že tyto hodnoty jsou srovnatelné se sloučeninami jako purvalanol A a olomoucín II, kde hodnota IC_{50} pro purvalanol A je 0,05 μ M a pro olomoucín II je 0,02 μ M (Kryštof *et al.*, 2002).

Měření cytotoxicity těchto látek na různé nádorové linie (např. MCF7, K562, HOS, G361 a další) opět ukázalo velmi dobré výsledky („Tab. 2“). Obě látky vykazovaly nižší IC_{50} než olomoucín II či roskovitin (Kryštof *et al.*, 2002). U látky **1** byla obecně hodnota IC_{50} vyšší v porovnání s látkou **2**, což je zřejmě způsobeno záměnou substituentu v poloze C2. Látka **1** byla neúčinnější na buněčnou nádorovou linii MCF7, což se jedná o karcinom prsu, kde IC_{50} bylo 2,73 μ M. Dále následovala linie lymfoidní leukemie a kolorektální adenokarcinom. Látka **2** vykazovala nejvyšší účinnost opět na linii MCF7, kde hodnota IC_{50} byla 1,4 μ M.



Obr. 20: Nově připravené 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu (látka **1** a **2**).

7 ZÁVĚR

Byly připraveny dvě nové látky, které patří do skupiny 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu, které jsou odvozeny od struktury roskovitinu, a to 4-chlor-2-[[2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-6-ylamino]-methyl]-fenol (látka **1**) a 4-chlor-2-[[2-((*S*)-2-hydroxy-1,2-dimethyl-propylamino)-9-isopropyl-9*H*-purin-6-ylamino] -methyl]-fenol (látka **2**). Tyto látky by měly mít vyšší metabolickou stabilitu zejména v pozici C2, kde v případě roskovitinu dochází k oxidaci hydroxyly primárního aminoalkoholu. Byla potvrzena jejich vysoká inhibiční účinnost na CDK2/cyklin E. Hodnota IC₅₀ pro látku **1** je 0,033 μM a hodnota pro látku **2** je 0,051 μM. Z výsledků měření cytotoxicity vyplývá, že účinnější látkou je látka **2** vykazující nižší hodnoty IC₅₀ než látka **1**.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*, pp. 572-578, Espero Publishing, Ústí nad Labem.
- Blagosklonny M.V. (2004) Flavopiridol, an inhibitor of transcription: Implications, problems and solutions. *Cell Cycle* **3**, 1537 – 1542.
- Code E.L., Crespi C.L., Penman B.W., Gonzalez F.J., Chang T.K., Waxman D.J. (1997) Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug. Metab. Dispos.* **25**, 985–993.
- Červenková K., Belejová M., Chmela Z., Rypka M., Riegrová D., Michnová K., Michalíková K., Šúrová I., Břejcha A., Hanuš J., Černý B., Fuksová K., Havlíček L., Veselý J. (2003) In vitro glycosidation potential towards olomoucine-type cyclin-dependent kinase inhibitors in rodent and primate microsomes. *Physiol. Res.* **52**, 467-474.
- Diehl J.A. (2002) Cycling of cancer with cyclin D1. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 226-231.
- Fattaey A., Booher R.N. (1997) Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog. Cell Cycle Res.* **3**, 233-240.
- Fischer et. al (2009) 2,6,9-substituted purine derivatives and their use in the treatment of proliferative disorders. US 7612079B2.
- Fischer P.M., Lane D.P. (2000) Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics. *Current Medicinal Chemistry* **7**, 1213-1245.
- Galons H., Oumata N., Meijer L. (2010) Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.* **20**, 377 – 404.
- Golias C.H., Charalabopoulos A., Charalabopoulos K. (2004) Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. J. Clin. Pract.* **58**, 1134–1141.
- Gibson S. E. , Mainolfi N., Kalindjian S. B., Wright P. T., White A. J .P. (2005) A new class of non-racemic chiral macrocycles: A conformational and synthetic study. *Chem. Eur. J.* **11**, 69-80.
- Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M., Norman T.C., Kwon S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S.H., Lockhart D.J., Schultz P.G. (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**, 533-538.
- Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P.P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 493–505.

- Guengerich F.P. (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 1–17.
- Hammarton T.C., Mottram J.C., Doerig Ch. (2003) The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog. Cell. Cycle Res.* **5**, 91 – 101.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* **40**, 408 – 412.
- Chang Y.T., Gray N.S., Rosania G.R., Sutherlin D.P., Kwon S., Norman T.C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P.G. (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **6**, 361-375.
- Chellappan S.P., Giordano A., Fisher P.B.(1998) Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **227**, 57–103.
- Chmela Z., Veselý J., Lemr K., Rypka M., Hanuš J., Havlíček L., Kryštof V., Michnová L., Fuksová K., Lukeš J. (2001) In vivo metabolism of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine in mice: glukosidation as the principal metabolit route. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 326-334.
- Imbach P., Capraro H. G., Furet P., Mett H., Meyer T., Zimmermann J. (1999) 2,6,9-trisubstituted purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 91-96.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 417 – 425.
- Kryštof V., Chamrád I., Jorda R., Kohoutek J. (2010) Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Med. Res. Rev.* **40**, 646-666.
- Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3283-3286.
- Kryštof V., McNae I.W., Walkinshaw M.D., Fischer P.M., Müller P., Vojtěšek B., Orsag M., Havlíček L., Strnad M. (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 1763 – 1771.
- Lapenna S., Giorgano A. (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 547-566.

- Legraverend M., Ludwig O., Bisagni E., Leclerc S., Meijer L., Giocanti N., Sadri R., Favaudon V. (1999) Synthesis and *in vitro* evaluation of novel 2,6,9-trisubstituted purines acting as cyclin-dependent kinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1281-1293.
- Malumbres M., Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153 – 166.
- McClue S.J., Stuart I. (2008) Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine) in vitro and in vivo. *Drug. Metab. Dispos.* **36**, 561-570.
- Meijer L., Arion D., Golsteyn R., Pines J., Brizuela L., Hunt T., Beach D. (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J.* **8**, 2275-2282.
- Meijer L., Raymond E. (2003) Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc. Chem. Res.* **36**, 417 – 425.
- Neant I., Guerrier P. (1988) 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* **176**, 68-79.
- Nutley B.P., Raynaud F.I., Wilson S.C., Fischer P.M., Hayes A., Goddard P.M., McClue S.J., Jarman M., Lane D.P., Workman P. (2005) Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 125-139.
- Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Siglerová V., Strnad M., Koča J. (2000) Docking- based development of purine-like inhibitor of cyclin-dependent kinase-2. *J. Med. Chem.* **43**, 2506-2513.
- Pippin J.W., Qu Q., Meijer L., Shankland S.J. (1997) Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J. Clin. Invest.* **100**, 2512 – 2520.
- Raynaud F.I., Whittaker S.R., Fischer P.M., McClue S., Walton M.I., Barrie S.E., Garrett M.D., Rogers P., Clarke S.J., Kelland L.R., Valenti M., Brunton L., Eccles S., Lane D.P., Workman P. (2005) In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4875-4887.
- Rizzolio F., Tuccinardi T., Caligiuri I., Lucchetti Ch., Giordano A. (2010) CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Curr. Drug. Targets* **11**, 279-290.
- Ruas M., Peters G. (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, 115-177.
- Rypka M., Veselý J., Chmela Z., Riegrová D., Červenková K., Havlíček L., Lemr K., Hanuš J., Černý B., Lukeš J., Michalíková K. (2002) In vitro biotransformation of 2,6,9,-trisubstituted

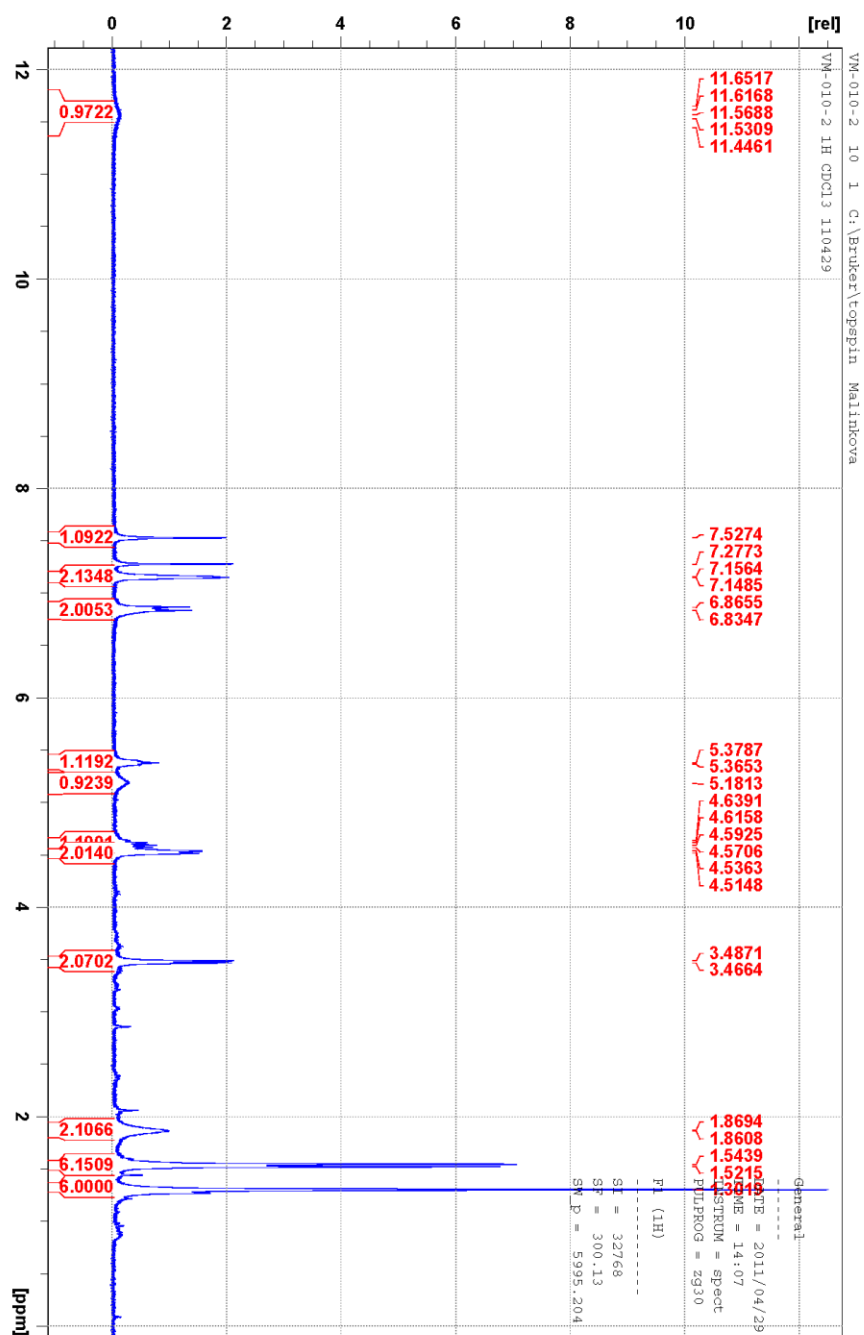
- purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemine by mouse liver microsomes. *Xenobiotica* **32**, 1017-1031.
- Senderowicz A. M., Headlee D., Stinson S. F., Lush R. M., Kalil, N., Villalba L., Hill K., Steinberg S. M., Figg W. D., Tompkins A., Arbusk S. G., Sausville E. A. (1998) Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2986-2999.
- Shapiro G.I. (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1770-1783.
- Shapiro G.I., Park J., Edwards C.D., Mao L., Merlo A., Sidransky D., Ewen M.E., Rollins B.J. (1995) Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **55**, 6200-6209.
- Sherr C.J., Roberts J.M. (1999) CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512.
- Vesely J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **224**, 771–786.
- Wang S., McClue S.J., Ferguson J., Hull J.D., Stokes S., Parsons S., Westwood R., Fischer P.M. (2001) Synthesis and configuration of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine and its enantiomer. *Tetrahedron Asymmetry* **12**, 2891-2894.
- Wesierska-Gadek, J., Kryštof, V. (2009) Selective CDK inhibitors discriminating between cell cycle and transcriptional kinases: Future reality or utopia? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 228 – 241.
- Whittaker S.R., Walton M.I., Garret M.D., Workman P. (2004) The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-Roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, cause loss of cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* **64**, 262 – 272.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

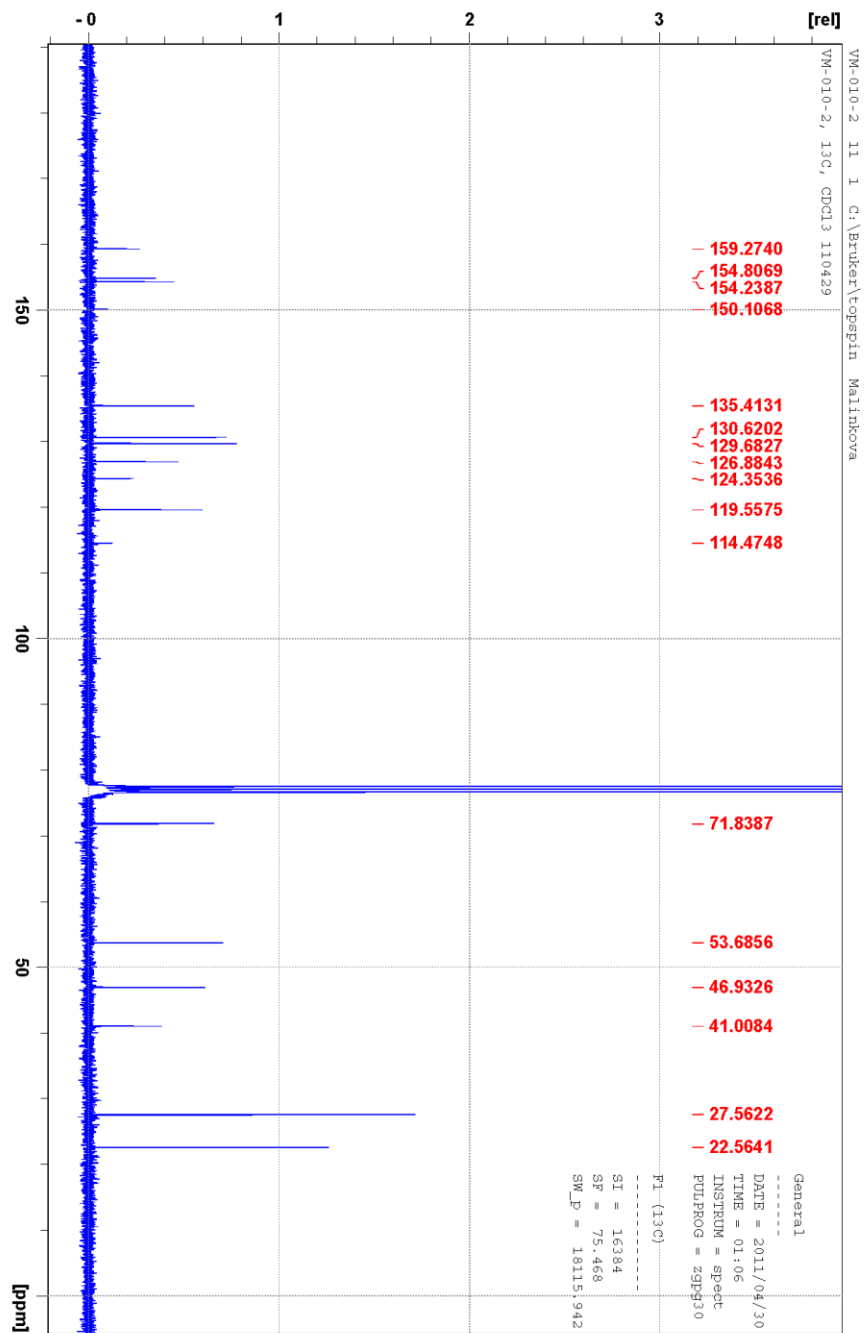
ATP	adenosin trifosfát
Boc ₂ O	di-tert. butyl bikarbonát
CDC25	Tyr fosfatasa (cell division cycle 25)
CDK	cyklin-dependentní kináza
Cip/Kip	přirozené inhibitory CDK (CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein)
CYC202	R-roskovitin
CYP P450	cytochrom P450
DCIP	2,6-dichlor-9-isopropylpurin
DIAD	diisopropyl azodicarboxylát
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DP-1	transkripční faktor rodiny DP-1
E2F	transkripční faktor rodiny E2F
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici enzymu
INK4	přirozený inhibitor CDK (inhibitor CDK4)
Mcl-1	antiapoptotický protein (myeloid-cell leukemia 1)
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
p ^{16INKA4}	CDK4 inhibitor p16-INK4A
Ph ₃ P	trifenylfosfin
pRB	retinoblastoma protein
RNA	ribonukleotidová kyselina

SKF-525A	Prodiafen – inhibitor cytochromu P450
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
UDP	uridin difosfát
XIAP	antiapoptotický protein (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

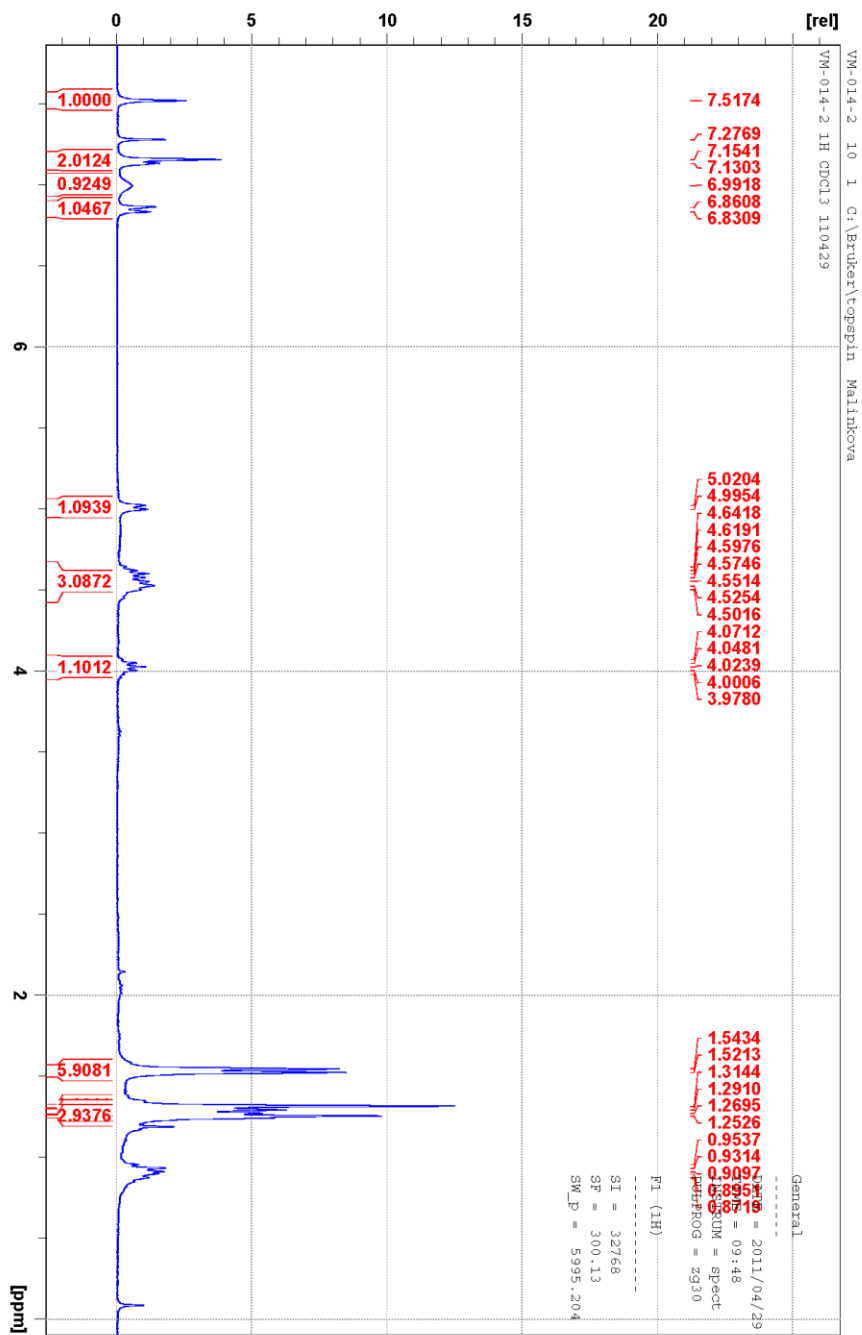
10 PŘÍLOHY



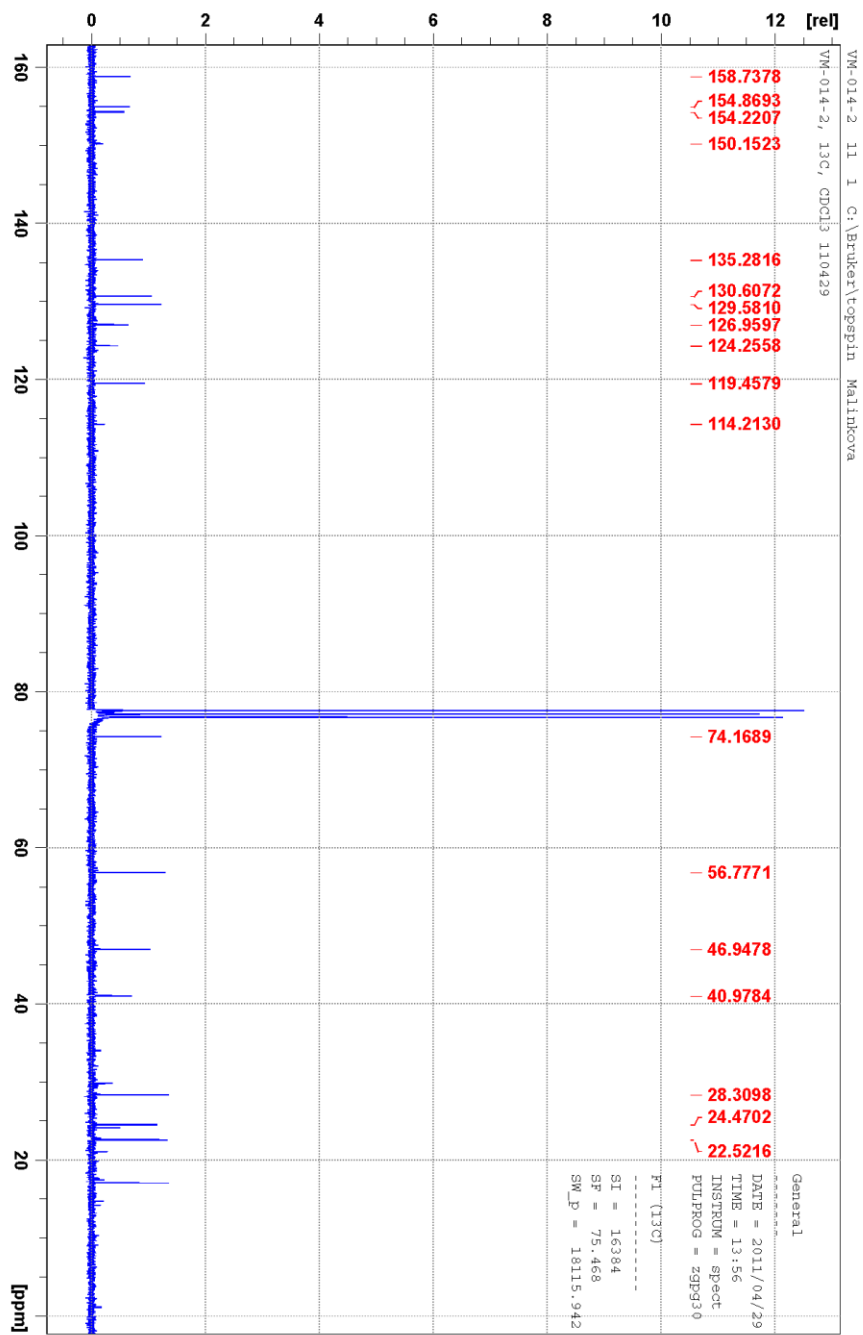
Příloha č. 1: ^1H NMR spektrum látky 1.



Příloha č. 2: ^{13}C NMR spektrum látky **1**.



Příloha č. 3: 1H NMR spektrum látky 2.



Příloha č. 4: ^{13}C NMR spektrum látky 2.