

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



**SYNTÉZA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA NOVÝCH
2, 6, 9 – TRISUBSTITUOVANÝCH - 8- AZAPURINŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Gabriel Gonzalez
Studijní program:	Bakalářský
Studijní obor:	Bioorganická chemie B1407
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	15.5.2014

Olomouc 2014

Chtěl bych tímto srdečně poděkovat RNDr. Marku Zatloukalovi, Ph.D. a RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za jejich ochotu, cenné rady, kritické připomínky, velkou trpělivost, velice přátelký přístup a nepřetržitou motivaci při řešení a zpracování dané problematiky. Rád bych také upřímně poděkoval všem pracovníkům a přátelům z Laboratoře Růstových Regulátorů PřF UP, zejména Aste Žukauskaité Dr., Ph.D., doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. a Mgr. Jaroslavu Nislerovi, Ph.D. za ochotu, pomoc a příjemnou pracovní atmosféru. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu a trpělivost.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem RNDr. Marka Zatloukala, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Gabriel Gonzalez
Název práce:	Syntéza a Biologická aktivita nových 2, 6, 9-trisubstituovaných-8 -azapurinů
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014

Abstrakt:

Bioisostery odvozené od purinů nabízí široké rozpětí aplikace v medicíně. Jsou rozděleny do čtyř skupin, dle počtu atomů dusíku začleněných do skeletu. Bakalářská práce je zaměřena na jednu z těchto skupin. Zvolená skupina 8-azapurinů, obecně známých jako 1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidiny, je bioisosterní skupina s pěti atomy dusíku začleněnými ve svém skeletu. Bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část obsahuje syntetickou a biologickou kapitolu. Hlavním cílem syntetické teoretické části je seznámení se s některými metodami přípravy 8-azapurinů. Tato kapitola je následována poměrně široce popsanou biologickou teoretickou částí. Kapitola věnovaná biologické problematice je převážně zaměřena na molekulární cíle. Získána fakta z této kapitoly jsou dále rozvedena z pohledu použitých modifikací na koncových derivátech MARK I.-IV. V praktické části jsou široce popsány výsledky obdržené z optimalizací jednotlivých kroků syntézy a biologické aktivity koncových látek MARK I.-IV. Dále byly získané výsledky z biologických testů porovnány s předchozí připravenou generací 2,6,9-trisubstituovaných-8-azapurinů a parentními deriváty purinů (CR8 a látkou C). Zejména biologické testy na CDK2/cyklinu A a buněčných liniích (K-562 a MCF7) poukázaly na velmi zajímavá fakta.

Klíčová slova:	Optimalizace, 2,6,9-trisubstituované-8-azapuriny, cyklin-dependentní kinázy, CDK-inhibitory, Roskovitin, Purvalanol A, CR8, 2,6,9-trisubstituované puriny, anti-proliferační efekt
Počet stran:	58
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Gabriel Gonzalez

Title: Synthesis and Biological activity of Novel 2,6,9-trisubstituted-8-azapurines

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc

Supervisor: RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract:

Purine derived bioisosteres can offer wide range of application in medicinal chemistry. They are divided in four groups according to number nitrogen atoms which can be incorporated in skeleton. The bachelor thesis is focusing on one of these groups. The selected group 8-azapurines generally known as 1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidines is bioisosterical group with five nitrogen atoms incorporated in its skeleton. The bachelor thesis is divided to theoretical and practical part. The theoretical part contains synthetical and biological chapter. The main goal of synthetical theoretical part is to introduce some synthetical methods of preparation 8-azapurines. This chapter is followed by relatively widely described biological theoretical part. The chapter dedicated to biological issue is predominantly focused on molecular targets. Obtained facts from this chapter are elaborated further in view of the modifications of final derivatives MARK I-IV. In the practical part are widely described results obtained from optimization of each step of whole synthesis plus biological activity of final compounds MARK I-IV. In addition, results from biological tests were received and compared with some previous prepared 2,6,9-trisubstituted-8-azapurines and parental purine derivatives (CR8 and compound C). biological tests on CDK2/cyclin A and cell lines (K-562 and MCF7) showed very interesting facts.

Keywords: Optimization, 2,6,9-trisubstituted-8-azapurine, cyclin dependent kinases, CDK-inhibitors, Roscovitine, Purvalanol A, CR8, 2,6,9-trisubstituted purines, anti-proliferative effect

Number of pages: 58

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Seznam použitých zkratek

Asp145	kyselina asparagová (145. v pořadí sekvence daného proteinu)
ATP	adenosintrifosfát
DCM	dichlormethan
CDK 1-9	cyklin dependentní kinázy 1-9
DIPEA	N,N'-diisopropylethylamin
Cip/Kip	CDK interagující protein/Kinázu Inhibující Protein
CKI	CDK-inhibiční proteiny
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
EtONa	ethanolát sodný
G361	buněčná linie lidské melanomu
HMDS	hexamethylsilazan
HOS	buněčná linie lidského osteo-sarkomu (kostní tumor)
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení hmotnostní spektrometrií
IC ₅₀	poloviční maximální koncentrace inhibice
Ile10	isoleucin (10. v pořadí sekvence daného proteinu)
K-562	buněčná linie lidské leukémie
MCF7	buněčná linie lidské rakoviny prsu
MeOH	methanol
Phe80,82	fenylalanin (80. a 82. v pořadí sekvence daného proteinu)
PKC	protein kinaza C
pRB	retinomablastomový protein
R1-CN	substituovaný nitryl
R1-COOEt	substituovaný ester karboxylové kyseliny
R(1,2)-NH ₂	substituovaný amin
RNA	ribonukleová kyselina
RS	reakční směs
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	vztahy mezi strukturou a aktivitou (Structure Activity Relationship)
t-BuOH	terc-butanol

t-BuOK	terc-butanolát draselný
thr14	threonin (14. v pořadí sekvence daného proteinu)
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie

Obsah

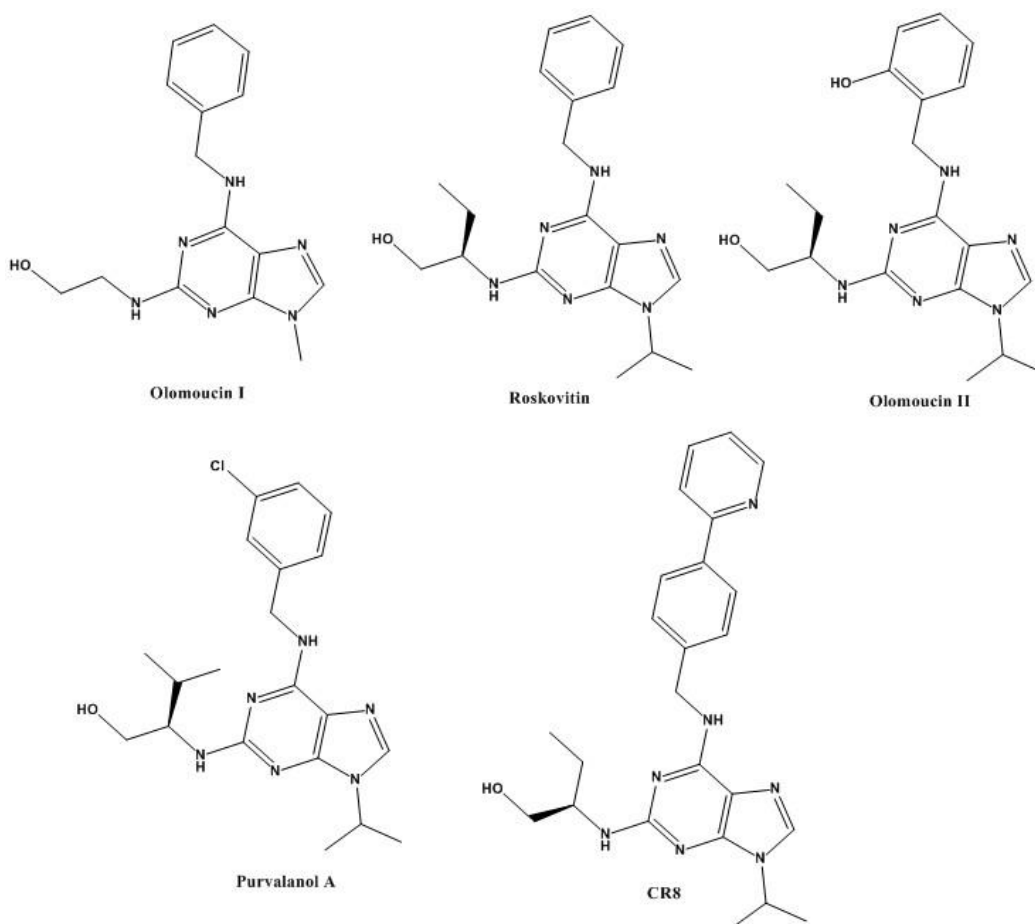
Úvod.....	10
Cíle bakalářské práce	14
Teoretická část	15
1 Syntéza 8-azapurinů.....	15
1.1 Počátky výzkumů 8-azapurinů.....	15
1.2 Syntetické metody výstavby 8-azapurinů	16
1.2.1 Syntetická metoda vycházející z pyrimidinového kruhu	16
1.2.2 Syntetická metoda vycházející z 1,2,3-3 <i>H</i> -triazolového kruhu	17
2 Molekulární cíle	18
2.1 – Cyklin-dependentní proteinkinázy	18
2.1.1 – Inhibice cyklin-dependentních proteinkináz	20
2.2 – Vývoj syntetických CDK-inhibitorů	22
2.2.1 CDK-inhibitory - obecný přehled	22
2.2.2 Purinové CDK-inhibitory	26
2.2.3 2,6,9 – Trisubstituované 8-azapuriny, potenciální CDK2 inhibitory	29
3 Výsledky a diskuze	31
3.1 Syntéza a její optimalizace.....	31
3.1.1 Azidace.....	32
3.1.2 Cyklizace I.	33
3.1.3 Cyklizace II.	35
3.1.4. Chlorace	38
3.1.5 Derivatizace (V.) a (VI.)	40
3.2 Biologická aktivita koncových derivátů.....	41
4 Experimentální část.....	44
4.1 Analytické metody	44
4.2 Použité chemikálie	44
4.3 Metody	45
4.3.1 Příprava Cyklopentyl azidu (I.).....	45
4.3.2 Příprava Benzyl azidu (I.)	45
4.3.3 Příprava 5-Amino-1-cyklopentyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.).....	46
4.3.4 Příprava 5-Amino-1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.).....	46

4.3.5	<i>Příprava 3-Cyklopentyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion (III.)</i>	47
4.3.6	<i>Příprava 3-Benzyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion (III.)</i>	47
4.3.7	<i>Příprava 5,7-Dichloro-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin (IV.)</i>	48
4.3.8	<i>Příprava 3-Benzyl-5,7-dichloro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidine (IV.)</i>	48
4.3.9	<i>Příprava 5-Chloro-3-cyklopentyl-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (Va.)</i>	48
4.3.10	<i>Příprava 5-Chloro-N-(3-chlorofenyl)-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (Vb.)</i>	49
4.3.11	<i>Příprava N⁵-(4-Aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl-N⁷-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7-diamin(VI. – MARK I.)</i>	49
4.3.12	<i>Příprava N⁵-(4-Aminocyklohexyl)-N⁷-(3-chlorofenyl)-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7-diamin (VI. – MARK II.)</i>	50
4.3.13	<i>Příprava 3-Cyklopentyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (VI. - MARK III.)</i>	51
4.3.14	<i>Příprava N-(3-Chlorofenyl)-3-cyklopentyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5 d]pyrimidin-7-amin (VI. – MARK IV.)</i>	52
5	Závěr	53
	Seznam použité literatury.....	54

Úvod

Modifikované purinové báze nukleových kyselin Adeninu a Guaninu, či rostlinné růstové regulátory, například cytokininy, hrají významnou roli na poli výzkumu nových léčiv. Nejen rozličné množství substituovaných derivátů v polohách C2, C6 a N9, ale i zásah do purinového skeletu nabízí rozsáhlé možnosti využití.

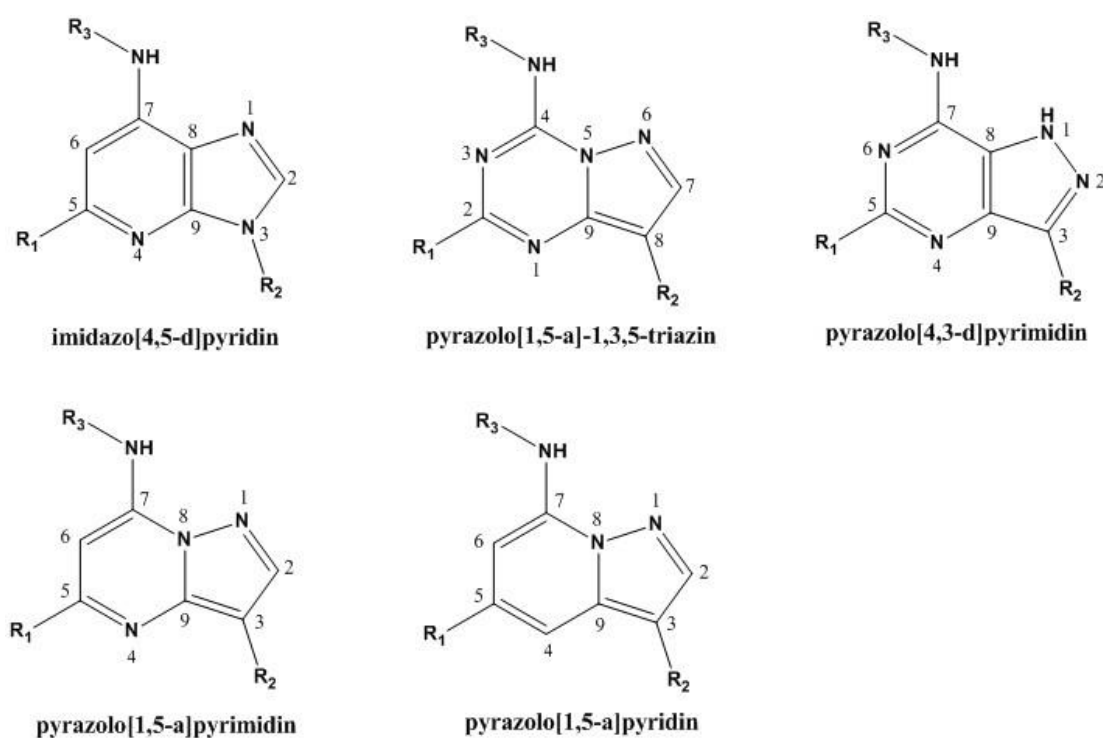
Je tomu 20 let, kdy byl pod vedením profesora Strnada a jeho týmu z Laboratoře Růstových Regulátorů UP a ÚEB AVČR, objeven Olomoucín. Látka zcela přírodního motivu, z řad rostlinných hormonů – cytokininů, která prokázala schopnost potlačovat aktivitu kináz buněčného cyklu.^[1] Následně byl odstartován rozsáhlejší výzkum 2,6,9 – trisubstituovaných purinů. Právě tento motiv se ukázal i po 20 letech velmi účinný zvláště v boji proti rakovině, neboť trisubstituované deriváty purinů vykazují výraznou inhibiční aktivitu na kinázách, regulující buněčný cyklus (tzv. cyklin dependentní kinázy). Celá série CDK inhibitorů byla odstartována pilotní sloučeninou, dále přes Roskovitin, Olomoucín II, Purvalanol A,^[51] až po nejnovější derivát CR8^[52] (viz obr. 1).



Obr. 1 - Inhibitory CDK

Jak již bylo zmíněno výše, modifikace purinového skeletu je jedna z cest, která nabízí širokou škálu potenciálních účinků. Celá řada purinových bioisosterů prokázala zajímavou biologickou aktivitu v inhibici cyklin dependentních kináz (CDK). Jejich inhibiční aktivita byla v některých případech podobná jako u purinů, u některých derivátů překvapivě vyšší, obvykle však nižší. Příkladem látek s podobnou, či vyšší afinitou a selektivitou k CDK, z třídy třídušikatých bioisosterů prokazujících stejný účinek jsou Imidazo[4,5-d]pyridiny^[2], (viz obr. 2).

Naopak látky s vyšší aktivitou, nežli parentní purinový skelet, vykazuje skupina čtyř typů bioisosterů, čtyřdušikaté: pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triaziny, pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny, třídušikaté: pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny a dále také dvoudušikaté: pyrazolo[1,5-a]pyridiny^[5] (viz obr. 2).

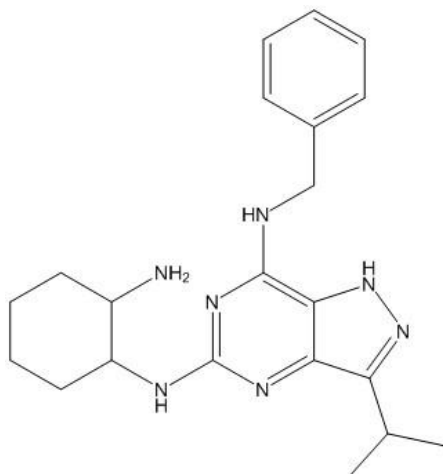


Obr. 2 - Biologicky aktivní bioisosterní skelety

V prvním případě se jedná o substituované pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triaziny, u kterých bylo připraveno velké množství derivátů, zahrnujících analog purvalanolu A a roskovitinu.^[6] Jeden z připravených analogů roskovitinu, zvaný 7a (N-&N1, GP0210, NSC 743927) se ukázal jako částečně selektivním CDK inhibítorem, především s 2-3krát větší aktivitou, nežli roskovitin samotný. Zároveň je zajímavé, že se tento derivát váže v aktivním místě CDK2

podobně jako roskovitin.^[7] Průměrně je látka 7a (N-&N1, GP0210, NSC 743927) čtrnáctkrát účinnější, nežli roskovitin, což bylo dokázáno v testech za použití *in vitro* screeningu na šedesáti nádorových liniích (The Human Tumor Cell Line Assay (NCI-60)).^[6]

Dalšími zástupci z řad velmi aktivních, čtyřdusíkatých bioisosterů, jsou pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny. Ve zmíněné řadě látek byly zprvu připraveny pouze 3-, 7- disubstituované deriváty^[8], nicméně se ukázaly účinnějšími, nežli původní purinový skelet. Z tohoto důvodu se pokládalo za nezbytné nasyntetizovat i trisubstituovaná analoga v polohách 3,5, a 7^[9]. Například, LGR-1406 - ukázkový derivát z rodiny bioisosterů (viz obr. 3) se jevil jako potenciální inhibitor cévních buněk hladkého svalstva s abnormální proliferací. Patologické chování těchto buněk přispívá k zúžování cév, tzv. patogenezi restenózy. Studie uvádějí porovnání Roskovitinu s LGR-1406 z hlediska inhibice CDK. V uvedené studii se tentýž derivát ukázal jako méně účinným, avšak dokázal zastavit proliferaci cévních buněk hladkého svalstva.^[10]



Obr. 3 – Látka LGR-1406

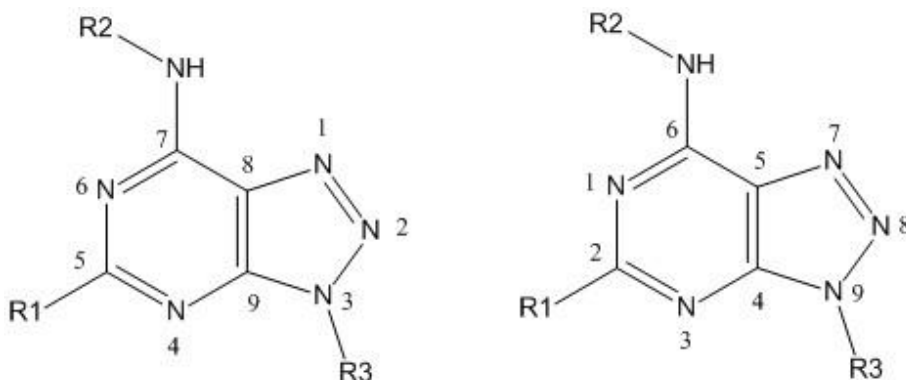
Důležitým faktem však zůstává, že roskovitinový analog ve zmíněné řadě prokázal lepší vlastnosti z hlediska anti-protein kinázové selektivity a protirakovinové aktivity po porovnání s původním motivem^[10], bez ohledu na analogický způsob vázání do aktivního místa CDK2. Existující vlastnost následně prokázala rentgenostrukturní analýza krystalu (PDB: 3PJ8)^[5].

Jednou ze sloučenin z rodiny třídusíkatých pyrazolo[1,5-a]pyrimidinů, kterou nelze opomenout je Dinaciclib. Uvedený derivát, který byl zvolen po úspěšných preklinických testech, postoupil do sérií klinických fází testování^{[3], [12]}. Velmi zajímavým faktem u této sloučeniny se jeví inhibiční aktivita vůči CDK2, která je řádově nanomolární^{[3], [13], [14], [15]}. Nicméně, po porovnání Roskovitinu s pyrazolo[1,5-a]pyrimidiným analogem, nebyla zjištěna výraznější selektivita^[4].

V našem případě jsme pro syntézu a následnou biologickou aplikaci zvolili pěti dusíkatý bioisoster 8-azapurin, systematicky: 1,2,3 - triazolo[4,5-d]pyrimidin. Látky 8-azapurinového charakteru se z hlediska heterocyklické chemie řadí mezi poměrně starší motivy, ale naopak z pohledu biologické aktivity skýtají velký potenciál.

Cíle bakalářské práce

Hlavním cílem práce je syntéza 2,6,9 – trisubstituovaných 8-azapurinů, její optimalizace a následné studium biologické aktivity.



Obr.4 - Skelet triazolo[4,5-d]pyrimidinu (číslování vlevo), triviálně 8-azapurin (číslování dle purinů – vpravo)

Níže je uvedeno shrnutí jednotlivých cílů práce:

- Syntéza 8-azapurinů z klíčových výchozích látek: cyklopentyl, resp. benzyl halogenid a azid sodný
- Optimalizace syntézy s ohledem na výtěžnost jednotlivých, syntetických kroků, dále také na jednoduchost metodiky zpracování meziproductů.
- Identifikace meziproductů a konečných productů, analytickými metodami (^1H , ^{13}C NMR, HPLC-MS).
- Studium biologické aktivity:

Biologické testy:

- na buněčných liniích: MCF-7 a K562
- inhibice CDK2

Teoretická část

Teoretická část práce se zabývá problematikou syntézy 8-azapurinů a studiem jejich potenciálních molekulárních cílů - cyklin-dependentních kináz.

1 Syntéza 8-azapurinů

1.1 Počátky výzkumů 8-azapurinů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, 8-azapurinový skelet není na poli heterocyklické chemie žádnou novinkou. Některé literární prameny se o 8-azapurinech zmiňují už v letech 1945^[16] a 1950^[17]. Jednalo se však o syntézu 8-azaguaninu, (dle tehdejšího systematického názvu: 5-amino-7-hydroxy-*v*-triazolopyrimidin), který později našel uplatnění jako protiplísňové antibiotikum. Dále byl uvedený derivát podroben testům jako látka s potenciálními protirakovinovými vlastnostmi.^[18]

Celý koncept syntézy 8-azaguaninu spočíval v diazotaci a následné cyklizaci, za tvorby triazolového kruhu pomocí nitrosylového kationtu (dusitany v kyselém prostředí, substituované nitrity apod.), z výchozí látky 2,4,5-triamino-6-hydroxypyrimidinu (viz schéma č. 1).^[16]

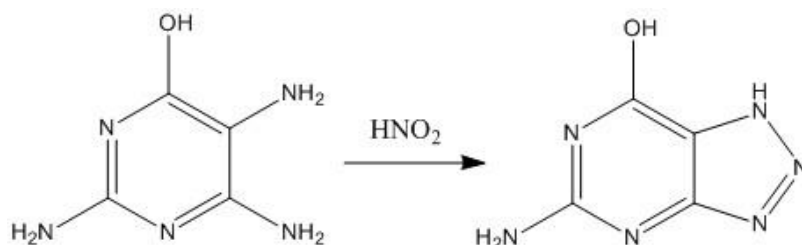


Schéma č. 1 – Syntéza 8-azaguaninu

Jedno z největších překvapení v oblasti chemie 8azapurinů, resp. v oblasti výzkumu 8-azaguaninu přišlo o 17 let později od roku 1945, kdy dvojice japonských vědců publikovala práci, zabývající se izolací a určením struktury antibiotika, produkovaným bakteriemi rodu *Streptomyces Albus*. Následně mu byl přiřazen název *Pathocidin*.^[18] Další obrat přišel v roce 1961, kdy Anzai K. a Suzuki S. odhalili strukturu *Pathocidinu*. Za tímto tajemným antibiotikem se neskrývalo nic jiného, než 8-azaguanin.^[18]

1.2 Syntetické metody výstavby 8-azapurinů

1.2.1 Syntetická metoda vycházející z pyrimidinového kruhu

V průběhu času byly vypracovány dvě hlavní cesty syntézy 8-azapurinů. První vychází ze 4,5-diaminopyrimidinového skeletu. Po následné diazotaci a cyklizaci dostáváme výsledný 8-azapurinový skelet.

Dále je možné vytvořit substituovaný 8-azaadenin s využitím kyseliny dusité a poté v poloze C6, nukleofilní substitucí chlóru, primárním aminem viz.(schéma č.2.) [20]. Výchozími látkami pro tuto metodu jsou komerčně dostupné látky jako například: 5-nitro-4,6-dichloropyrimidin 5-Amino-4,6-dichloropyrimidin, 5-Amino-4,6-dichloro-2-methylpyrimidin, 6-chloropyrimidine-4,5-diamin a další. Velkou nevýhodou uvedené metodiky je vysoká cena výchozích látek, z tohoto důvodu jsme ji k syntéze nevyužili.

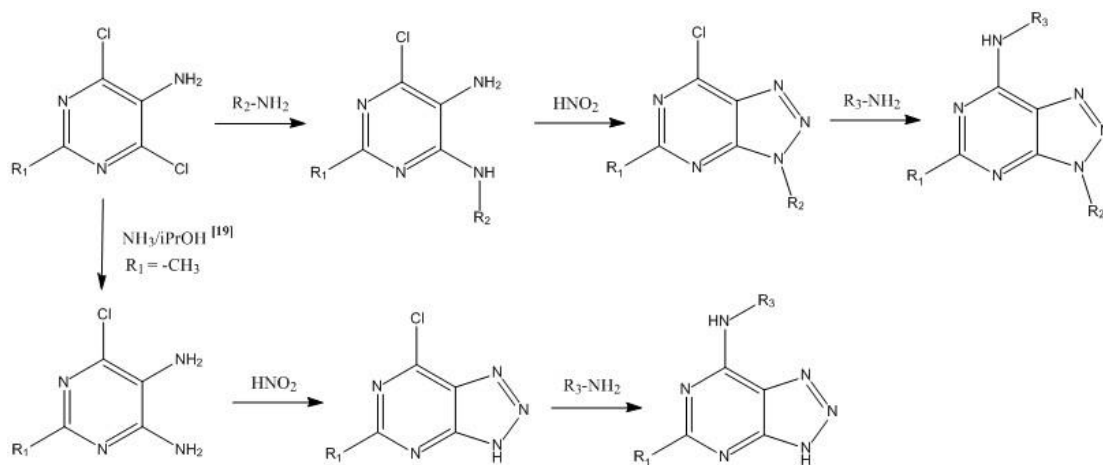


Schéma č.2 – Syntéza 8-azapurinů, vycházející z pyrimidinového skeletu

1.2.2 Syntetická metoda vycházející z 1,2,3-3H-triazolového kruhu

Druhá metodika vychází z konceptu výstavby triazolového cyklu a následné dostavby pyrimidinového kruhu. Nespornou výhodou daného postupu je cena výchozích látek. Metoda je dále rozdělena na dvě dílčí syntetické cesty. Obě vychází z reakce substituovaného azidu. V prvním případě se jedná o reakci s 2-kyanoacetamidem (přes 2,6,9-trisubstituovaný 8-azahypoxantin^{[21],[22]}, až na 2,6,9-trisubstituované 8-azapuriny (viz schéma č. 3, cesta I.)). V druhém případě je reaktantem malononitril (vedoucí k 2,9-disubstituovaným 8-azaadeninům^{[22],[23]} (viz schéma č. 3., cesta II.)).

V případě první cesty byla dle dostupné literatury připravena série 2,9 - disubstituovaného 8-azahypoxantinu, přes meziprodukt 5-amino-1-substituovaný-1,2,3-triazolo-4-karboxamid, který nebyl izolován, ale nasazen v dalším stupni s esterem příslušné kyseliny.^[24] Intermediát 2,9 - disubstituovaný 8-azahypoxantin, může být dále převeden na příslušný monochlor derivát pomocí POCl₃ (bez použití báze, což nezávisle potvrdily optimalizační reakce provedené v rámci této práce). Daný meziprodukt může být následně použit k syntéze 2,9-disubstituovaného a N⁶ - substituovaného 8-azaadeninu, za pomoci nukleofilní substituce (S_N2) atomu chlóru na pozici C6 požadovaným aminem. Rovněž je možné použití hexamethyldisilazanu (HMDS), vhodného aminu s 2,9-disubstituovaným 8-azahypoxantinem^[24].

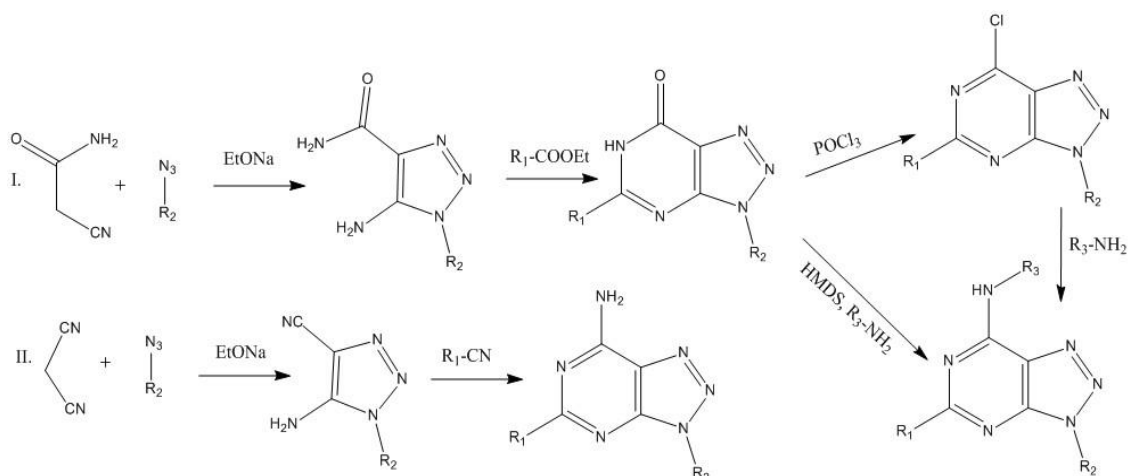


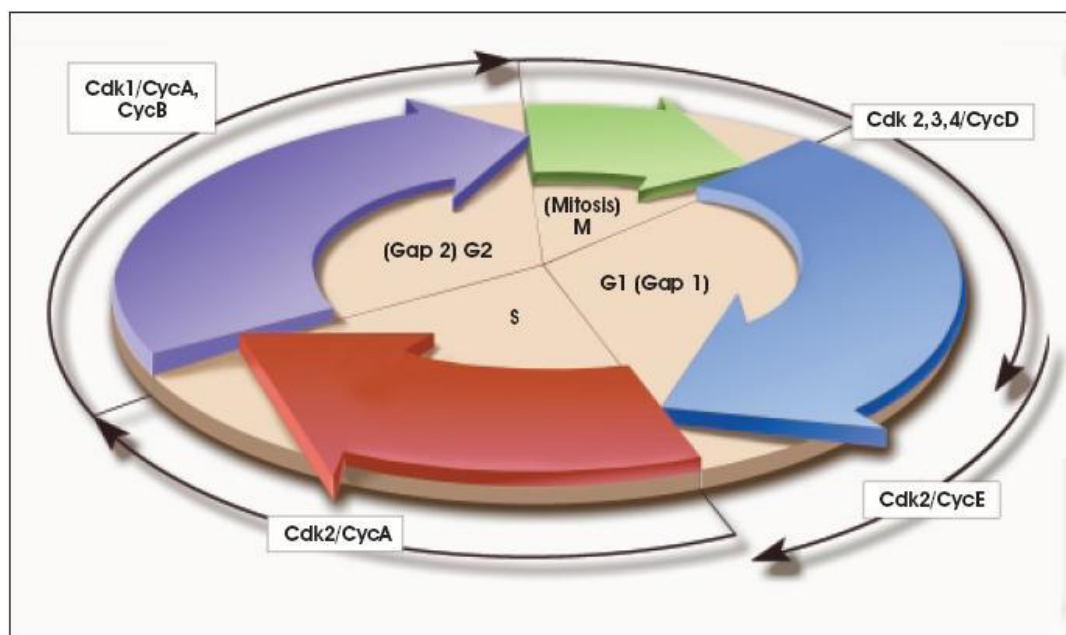
Schéma č. 3 – Syntéza 8-azapurinů, vycházející z výstavby triazolového cyklu

2 Molekulární cíle

2.1 – Cyklin-dependentní proteinkinázy

Všeobecně se onkologická onemocnění vyznačují zvýšenou proliferací buněk. Zásadní vliv na proliferaci nádorové i zdravé buňky, mají enzymy buněčného cyklu. Buněčný cyklus je nezbytný souhrn enzymatických dějů, pro vytvoření dceřiných buněk z buňky mateřské. Zahrnuje v sobě čtyři stádia, ve kterých se buňka nachází, přičemž každé stádium je pro replikaci buňky svou funkcí specifické.

Rozlišujeme následující čtyři stádia buněčného cyklu: G1, S, G2 a M. Přechody mezi jednotlivými stádii jsou přísně kontrolovány skrze regulační enzymy buněčného cyklu, mezi které se řadí cykliny a cyklin-dependentní proteinkinázy (CDK).^[29] Názvy těchto proteinů byly zvoleny cíleně. V rámci buněčného cyklu totiž dochází k nárůstu a poklesu koncentrací jednotlivých druhů cyklinu a cyklin-dependentních proteinkináz. Jak je patrné z obr. 5, každá dvojice cyklinu a cyklin-dependentní proteinkinázy funguje jako katalyzátor fosforylace dalších proteinů v kaskádě, na hydroxylových skupinách serinu a threoninu. Zmíněné děje probíhají vždy v rámci jednoho stádia, či fáze buněčného cyklu, proto se dané enzymy staly velmi oblíbenými molekulárními cíli pro vývoj syntetických CDK-inhibitorů, které by mohli sehrát významnou roli v léčbě onkologických onemocnění.^[30]



Obr. 5 – Schéma buněčného cyklu převzato z (Kirschstein a Skirboll, 2001)

Buněčný cyklus jako takový, je přísně kontrolovaným souborem enzymatických procesů, tudíž i přechody mezi jednotlivými fázemi mohou mít zásadní vliv nejen na buňku, ale i na celý organismus. Z těchto důvodů zde existuje systém kontrolních bodů, kde dochází k vyhodnocení připravenosti buňky pro vstup do další fáze. Mezi kontrolní body patří přechody G1/S a G2/M, kde může dojít k zastavení celého cyklu. Mimo použití klasických kontrolních bodů může buňka pozastavit buněčný cyklus i během replikace DNA v S-fázi a při dělení buňky v M-fázi.^[31]

Za přechody mezi jednotlivými fázemi jsou zodpovědné především koncentrační skoky cyklinů a jejich následná vazba na CDK. Principem cyklin-CDK indukovaných procesů, je uvolnění katalytického místa na CDK ihned po uskutečnění vazby, a právě tímto způsobem mohou aktivované proteinkinázy fosforylovat cílové proteiny celé kaskády. Mezi cykliny a CDK hraje poměrně velkou roli také jejich exprese během buněčného cyklu. Zatímco jsou cykliny exprimovány pouze v určité fázi, exprese CDK je prakticky kontinuální. V mnoha onkologických onemocněních dochází k deregulacím a především blokacím kontrolních bodů buněčného cyklu, což způsobuje i nekontrolovanou proliferaci buněk. S využitím znalostí o CDK a jejich vlivu na buněčný cyklus, bylo navrženo poměrně velké množství CDK-inhibitorů, které se dokáží navázat na vazebné místo příslušné CDK pro ATP. Specifická vazba na doménu pro ATP zamezuje fosforylaci proteinů následující v kaskádě.^[32]

Doposud je známo kolem devíti cyklin dependentních kináz, které přímo zprostředkovávají vazbu s cykliny (A-K a T). Blíže tedy k funkci některých cyklin dependentních proteinkináz. Z celkového počtu devíti CDK jsou do regulace buněčného cyklu zapojeny pouze CDK 1-6, zbylé hrají roli zejména v aktivaci transkripce, především skrze fosforylaci RNA polymerazi II. Některé druhy CDK mají tzv. dvojí funkci, mimo fosforylační funkci mohou také regulovat aktivaci ostatních CDK. Názorným příkladem tomu je u CDK7.^{[34],[35]} Většina CDK uplatňuje svůj vliv během interfáze (G1 – začátek S fáze), ale i zde lze najít výjimky jako například CDK1, která ovlivňuje buňku především jako mitotický regulátor.^{[34],[36]}

V regulaci buněčného cyklu také hrají velmi významnou roli další proteiny, jako například retinomablastomový protein (pRB), který ve své nefosforylované formě zabraňuje buňce zahájení buněčného cyklu.^{[34],[37]} Podstata jeho role při regulaci tkví ve vazbě na transkripční faktory (E2F), které jsou uvolněny po fosforylaci pRB, zprostředkované CDK4, CDK6 a později i CDK2. Uvolněné E2F transkripční faktory pak slouží k nastartování exprese genů nutných pro přechod přes kontrolní bod G1/S.^{[34],[36],[37]}

Kaskáda reakcí vedená k aktivaci CDK2 skrze cyklin E a následnými fosforylacemi, končí útlumem genů nutných pro iniciaci S fáze. Významný regulátor buněčného cyklu CDK2 fosforyluje ve své regulační dráze i mnohé další proteiny.^[38] Významný zlom nastává během

S fáze, ve které dochází k replikaci DNA, kdy CDK2 mění svého vazebného partnera cyklin E za cyklin A. I přesto, že se jedná o zdánlivě nepatrnou změnu, vede k inaktivaci E2F, čímž je udržen replikační aparát v chodu. [34], [36]

Důvodů, proč se blíže zabývat detailním popisem funkce CDK2 a zkoumáním jejího vlivu na buněčný cyklus je poměrně hodně. Jedním z nich je její přímý vliv na G1/S kontrolní bod buněčného cyklu, proto má inhibice CDK2 zásadní vliv a promítne se výrazným způsobem na fungování buňky.

Znalost výše zmíněného faktu o roli inhibice CDK2 byla nepostradatelnou při syntéze mnoha biologicky aktivních látek. Některé deriváty 2,6,9-trisubstituovaných purinů jsou velmi významnými zástupci ze skupiny CDK2-inhibitorů.

2.1.1 – Inhibice cyklin-dependentních proteinkináz

Správnou regulaci buněčného cyklu zprostředkovanou cykliny-CDK zajišťují buněčné inhibitory CDK tzv. CDK-inhibiční proteiny (CKI). Zmíněná skupina inhibitorů je dále rozdělena na dvě rodiny proteinů.

První rodinou je Cip/Kip tj. (CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein), ve které se nachází inhibitory p21^{CIP1}, p27^{KIP1} a p57^{KIP2}. Dané proteiny se účastní inhibice u CDK4, CDK6, CDK2 a CDK1. [31] Protein p21 se vyznačuje tím, že jeho transkripčním faktorem je p53, který hraje podstatnou roli jako marker zastavení buněčného cyklu či apoptózy. [41] Zásadní význam má také návaznost dějů spjatých s proteinem p21, který inhibuje CDK2. Jak bylo zmíněno výše, jeho exprese je řízena transkripčním faktorem p53, tudíž v okamžiku, kdy dojde k poruše DNA, je ihned exprimován. [42], [43]

Druhou rodinou se schopností inhibice CDK je INK4. Zahrnuje proteiny p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} a p19^{ARF}. Najdeme zde také rozdíly ve způsobu inhibice, například protein p16^{INK4a} inhibuje CDK4 a CDK6, oproti tomu p19^{ARF} se váže na MDM2 a blokuje destrukci p53. Dále také proteiny p15^{INK4B}, p18^{INK4C} a p19^{ARF} inhibují komplex CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D. [31]

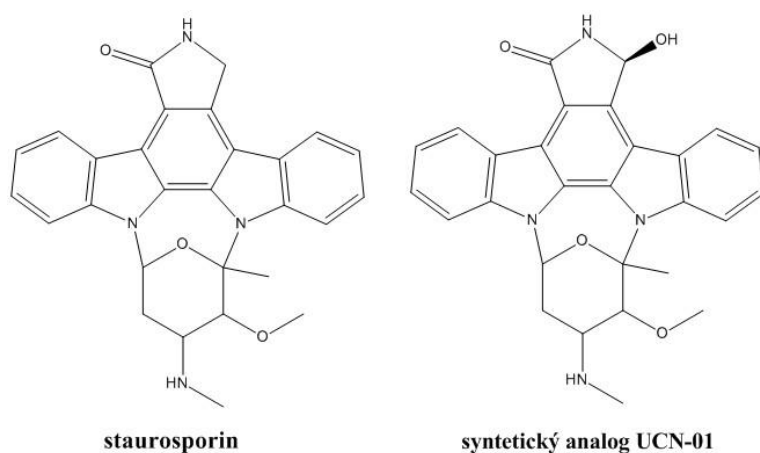
V mnoha rakovinových buňkách však dochází velmi často k mutacím genů pro INK4, méně často pak pro Cip/KiP. Na druhou stranu, k mutacím genů u proteinů p21 a p27 dochází pouze ve výjimečných případech. Pokud však dojde k mutacím genu p53 transkripčního faktoru, je výrazně ovlivněna aktivita p21 a regulace buněčného cyklu jako takového. Některé zdroje uvádějí velmi špatnou prognózu pro pacienty s nízkou hladinou p21, oproti tomu jiné uvádějí fatální vlivy vysoké hladiny p21. [41]

Velmi významný faktor, který ovlivňuje regulaci buněčného cyklu resp. přechod G1/S je mutace v genech pro p15 a p16. Důsledkem této mutace je narušena funkce pRB proteinu, skrze aktivaci CDK4-cyklin D1. U nádorových onemocnění je charakteristickým jevem zvýšená exprese cyklinu D1 a CDK4 a velmi častá inaktivace proteinu p16.

2.2 – Vývoj syntetických CDK-inhibitorů

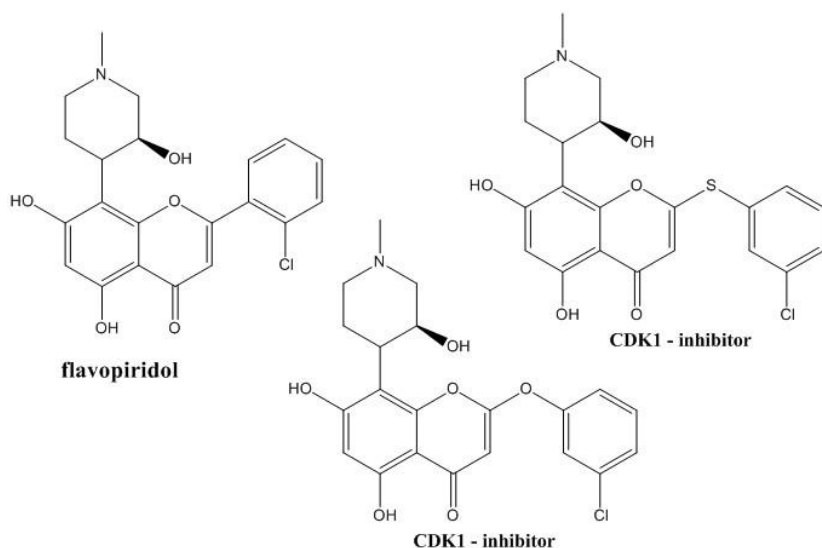
2.2.1 CDK-inhibitory - obecný přehled

V oblasti inhibice cyklin dependentních kináz, bylo syntetizováno velké množství látek s inhibiční aktivitou, ať už selektivní, či neselektivní vůči jednotlivým druhům CDK. Jednou z prvních látek, u které byla překvapivě objevena inhibiční aktivita je *Staurosporin*. Jedná se o přírodní látku produkovanou *Streptomyces sp.*, která je schopna inhibovat CDK1 a také proteinkinázu C (PKC). Tímto motivem byla samozřejmě inspirována další řada syntetických inhibitorů inhibujících mimo PKC a CDK2 v porovnání s parentním motivem Staurosporinem viz obr. 6. [30]



Obr. 6 – CDK inhibitory na bázi Staurosporinového skeletu

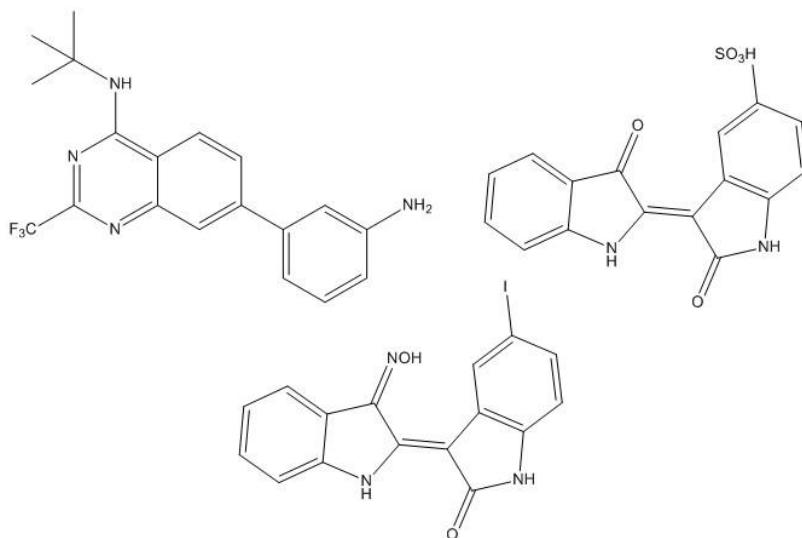
Další skupinou CDK-inhibitorů jsou látky odvozené od Flavopiridolu i samotný *Flavopiridol*, které jsou strukturně naprosto odlišné od předchozí skupiny. Tyto látky, speciálně *Flavopiridol*, patří do rodiny alkaloidů rohitukinu a strukturně příbuzného kvercetinu, inhibuje výrazným způsobem CDK1, CDK2 a CDK4. Z řady Flavopiridolů (viz obr. 7) jsou to 3-chlorfenoxy- a 3-chlorfenyl-sulfanyl- analoga, která vykazují poměrnou selektivitu v inhibici CDK1. [30]



Obr. 7 – Inhibitory CDK na bázi Flavoripidolu

Velké uplatnění jako potenciální CDK-inhibitory našly sloučeniny *chinazolinového* a *indolového* motivu (viz obr. 8), kdy deriváty chinazolinu prokázaly inhibiční účinky na CDK2 a CDK4. Indolové deriváty tzv. *indirubiny*, naproti tomu dokáží být velice účinnými v celém spektru CDK. ^[30]

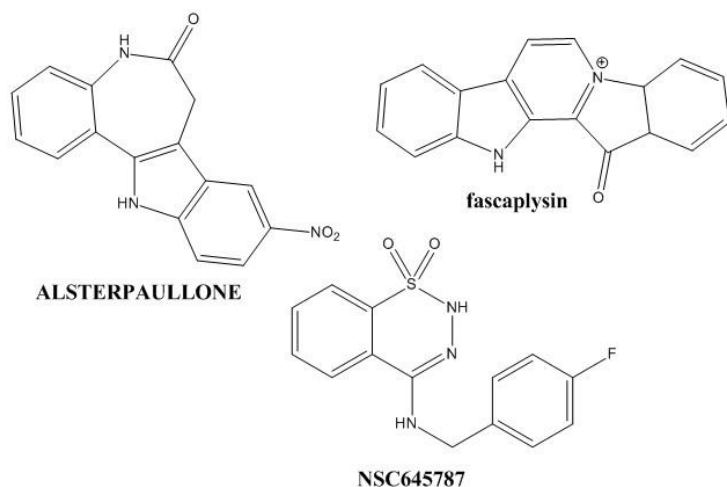
Poměrně velkou skupinu tvoří purinové CDK inhibitory, kterým je věnována samostatná kapitola.



Obr. 8 – CDK inhibitory na bázi chinazolinu a indolu tzv. indirubiny

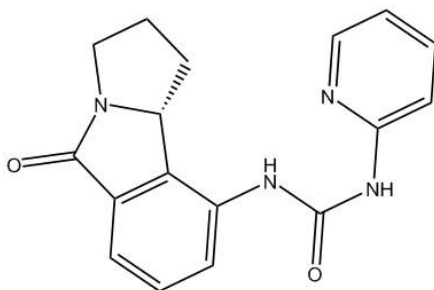
Předposlední skupinou inhibitorů CDK jsou tzv. *Paullony*. Vzniku těchto syntetických látek předcházelo *in silico* modelování vazebného místa pro ATP. Jak je z obr. 9 patrné, jedná se o benzazediazepinové deriváty, s širokospektrální inhibicí, mimo CDK4. Pro selektivní

inhibici CDK4 zde lze využít např. *fascaplysin* (přírodní látka z mořských hub *Fascaplysiium*) či látku NSC645787. ^[30]



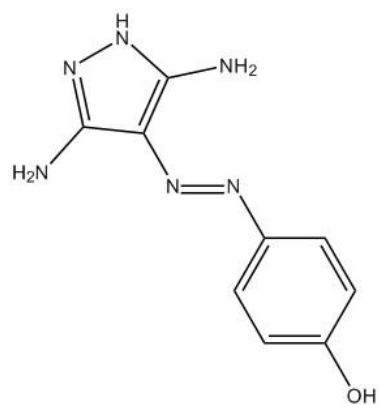
Obr. 9 – Příklad derivátu z rodiny inhibitorů Paullonů a selektivní inhibitory CDK4

Poslední skupinou CDK inhibitorů, které jsou zde uvedeny, jsou látky odvozené od diarylmočoviny (viz obr. 10). Jedná se o látky se schopností zastavit mitotické dělení buněk Molt-4 v G1 fázi, v intervalu koncentrací 0,1 – 0,4 μM . ^[30]



Obr. 10 – Příklad derivátu diarylmočoviny

Dále nemůže být opomenuta práce RNDr. Petra Cankaře, Ph.D. z Katedry Organické chemie, Univerzity Palackého v Olomouci zaměřená na deriváty 3,5 – diamino-1*H*-pyrazolu. Konkrétně derivát *CAN508* (viz obr. 11) prokázal o poznání vyšší afinitu k CDK9/cyklinu T1, nežli ostatní inhibitory CDK9, jako například Flavopiridoly. ^[46] Látka *CAN 508* navíc vykazuje i zajímavou anti-angiogenní aktivitu. ^{[44], [45]}



CAN 508 - inhibitor CDK2 a CDK9

Obr. 11 – *CAN 508, derivát 3,5-diamino-1H-pyrozolu*

2.2.2 Purinové CDK-inhibitory

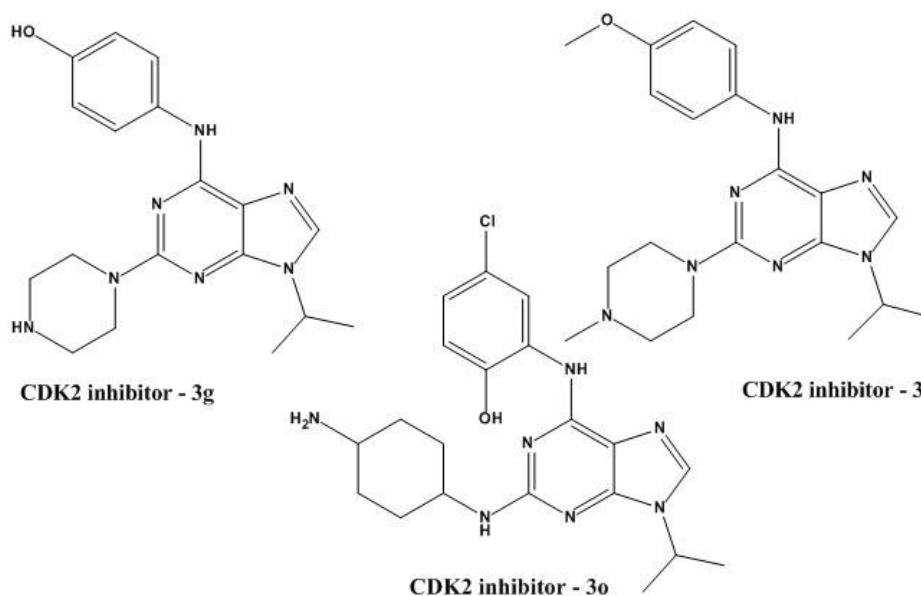
Vývoj purinových CDK inhibitorů měl nesporný vliv na tuto práci z hlediska použitých substituentů v pozicích C2, C6 a N9. Substituce využitá na nové sérii 2,6,9- trisubstituovaných 8- azapurinů patří mezi nejnovější. Jsou převzaty od purinových CDK inhibitorů Purvalanolu A a CR8. Látky typu CR8 a Purvalanol A patří v dnešní době mezi jedny z neaktivnějších CDK inhibitorů. Hlavním důvodem zaměření se v této práci právě na CDK inhibici je objev 2,6,9- trisubstituovaných purinů, látek schopných velice efektivně inhibovat zmíněné kinázy. Prvním zkoumaným CDK inhibitorem je Olomoucín, strukturně velice jednoduchý motiv 6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-purin (viz obr. 1), který vykazoval zajímavou antimitotickou aktivitu. Výhodou Olomoucínu se zdála také jeho relativní selektivita (CDK4 a CDK6). V důsledku poměrně jednoduché struktury byla možná i její další modifikace.^[39]

Nedlouho po objevu Olomoucínu, se na poli CDK inhibitorů objevil Roskovitin, systematicky - 6-(benzylamino)-2-[[1-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurin. Látky strukturně podobná, nicméně až 20krát účinnější, zejména v inhibici CDK1 a CDK2.^[40]

Při vývoji dalších CDK inhibitorů jako například Olomoucín II a Purvalanol se ukázalo, jak důležitý faktor hrají funkční skupiny na aromatickém jádře, které je vázané N⁶ pozici. V průběhu času se některé substituce staly poměrně zastaralými a byly nahrazeny novými a účinnějšími. Pro naši práci bylo důležité využití těch substitucí, které by zaručily žádanou biologickou aktivitu, tj. zastavení buněčného cyklu či apoptózu skrze inhibici CDK2. Mezi tyto použité substituce, na N9-cyklopentylové řadě 8-azapurinů jsme využili následujících substituentů, pozici C2: trans-1,4-diamino-cyklohexan, N-methylpiperazin a na pozici C6: 3-chloro-anilin a 4-(pyridin-2-yl)fenylmethylamin (CR8 - amin).

Z hlediska chronologie vývoje CDK inhibitorů na bázi purinů se tyto substituce do značné míry liší. Kupříkladu, oba C2 substituenty byly využity při syntéze novějších generací CDK2 inhibitorů (viz obr. 12), které strukturně vzešly z Olomoucínu II a Roskovitinu. Tato generace se vyznačovala jedním, různě substituovaným aromatickým jádrem. V sérii připravených derivátů byly v poloze C2 zahrnuty substituce jako piperazin-1-yl, N-methylpiperazin-1-yl, 4-aminocyklohexanamino a jiné další.^[48] Zajímavá fakta poskytla SAR (Structure Activity Relationship), těchto látek. Například, v rámci této řady derivátů bylo prokázáno, že C2 substituce piperazinem a N-methylpiperazinem a trans-1,4-diaminocyklohexanem, přispívají ke zvýšení celkové cytotoxicity látek (viz br. 12). Nicméně piperazinové a N-methylpiperazinové substituce, mají negativní vliv na selektivitu inhibice CDK2, neboť dochází k interakcím i s dalšími CDK a jinými kinázami. Dále zabraňují časté oxidaci substituentům s vázaným hydroxylem na karboxylovou skupinu, známé v případě

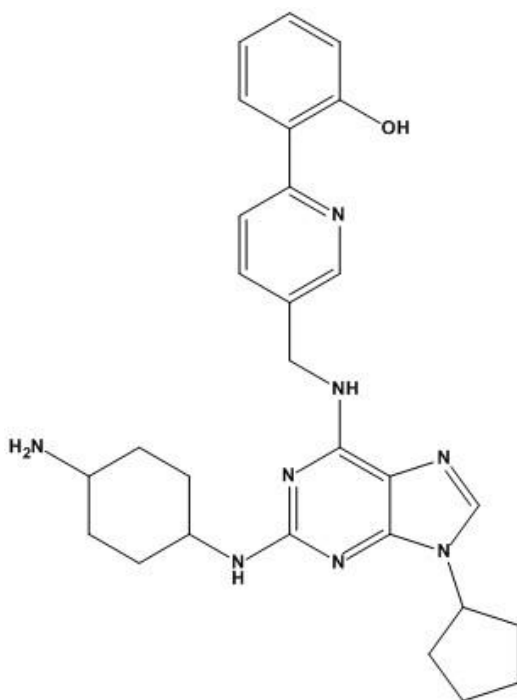
Roskovitinu tj. (u C2 substituentu (R,S)-2-aminobutan-1-ol). Zmíněná inhibice oxidace přispívá ke zvýšení anti-CDK aktivitě.^[46] Za zmínku stojí i aromatické jádro vázané přes methylenový můstek na pozici N⁶. Zajímavá pozorování byla dosažena porovnání aktivit derivátů, u nichž se funkční skupiny (především atomy halogenů), nacházely v meta poloze vzhledem k methylenovému můstku. Vylepšení oproti Olomoucinu II vedlo ke zvýšení inhibiční aktivity těchto derivátů^[48] a je zde zřejmá souvislost s nasazením C6 substituce 3-chloranilinem.



Obr. 12 – CDK2 inhibitory s aktivitou: látka **3g** ($CDK2 IC_{50} = 340 \text{ nM}$, $\text{cytotox.} = 9,2 \mu\text{M}$), **3i** ($CDK2 IC_{50} = 890 \text{ nM}$, $\text{cytotox.} = 12,6 \mu\text{M}$), **3o** ($CDK2 IC_{50} = 25 \text{ nM}$, $\text{cytotox.} = 2,4 \mu\text{M}$)

Závěrem bude věnována pozornost C6 substituci CR8-aminem a celkovému zhodnocení použitých modifikací na nových derivátech 2, 6, 9-trisubstituovaných-8-azapurinů. V nejnovější sérii 2,6,9- trisubstituovaných purinů se uplatnilo především biarylové uspořádání substituentu na pozici C6. V neposlední řadě N9 cyklopentylová substituce a na C2 pozici trans-1,4-diaminocyklohexan.^[29] V rámci dané série byly detailně prozkoumány i interakce mezi vazebným místem CDK2 a jednotlivými substituenty. Například, u trans-4-aminocyklohexan-amino skupiny byla zjištěna interakce s Asp145 a Thr14, z tohoto důvodu se substituent stal doposud nejlepší možnou alternativou. Následně použitý substituent na pozici C2, 4-hydroxycyklohexylamino skupina je také schopna vytvářet vodíkovou vazbu, ale pouze s jedním aminokyselinovým zbytkem, již zmíněný Asp 145.^[29] Co se týče N9 cyklopentylu, jedná se opět o skupinu, která zapadá do hydrofobní jamky poblíž vedlejšího řetězce Phe80. Větší objemnost samotného cyklopentylu ve srovnání s isopropylem (Roskovitin, CR8 a jiné

další deriváty purinů) nebo methylem (Olomoucín), přispívá také k vyšší afinitě k aktivnímu místu CDK2. V publikaci věnované biarylové řadě CDK2, je dále popsána interakce jednoho z neaktivnějších derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů – látka 6b (viz obr.13). S hodnotami IC_{50} inhibice na CDK2 (7,1nM) a CKD1 (47nM) nesrovnatelně převyšuje první a předchozí řady CDK-inhibitorů. Látka byla rovněž otestována na celé řadě rakovinových linií, kde se hodnota IC_{50} pohybovala v intervalu 0,016-0,035 μ M. [29]



Obr. 13 – CDK2 inhibitor, látka 6b

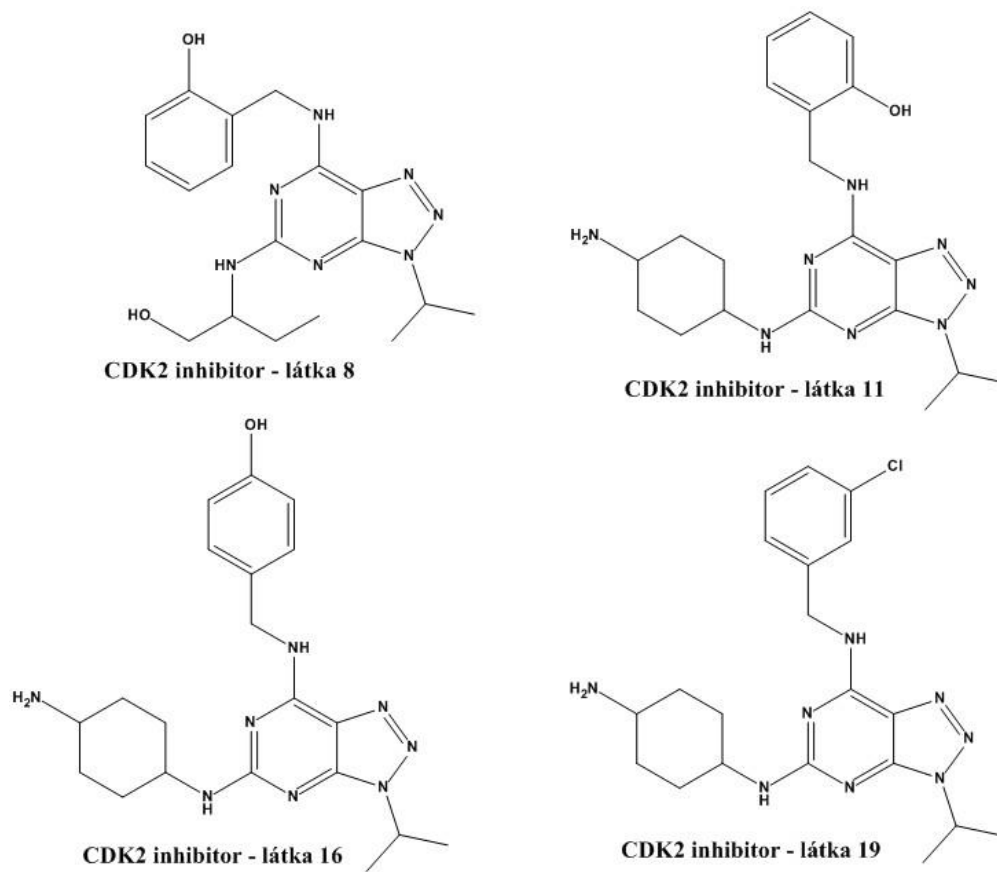
V následující části jsou rozvedeny důvody použití CR8 – aminu. Na krystalu CDK2/cyklinu A spolu s (R)-CR8 a (R) – Roskovitinem byly detailně zkoumány vlivy použitých substituentů. Výhodou biarylového uspořádání na pozici C6, je její vzdálenost oproti roskovitinovému aromatickému jádru. Velká elektronová hustota kolem pyridinového kruhu oproti benzyly u roskovitinu má za následek, že po vnoření do kapsy tvořené Ile10, Phe82 a Glu8 dochází ke zvýšení afinity dané látky a tím pádem selektivity a cytotoxických účinků. [49]

2.2.3 2,6,9 – Trisubstituované 8-azapuriny, potenciální CDK2 inhibitory

Jak již bylo zmiňováno v průběhu celé práce, postup při syntéze byl inspirována publikací doc. Havlíčka a kol.^[27] Jelikož bude v této části práce blíže rozvedena biologická aktivita, nemohou zůstat bez povšimnutí výsledky inhibice CDK2 a testů na buněčných liniích (viz tab. 1). Shodou okolností využil doc. Havlíček a kol. pro testování derivátů tytéž linie, které jsme zvolili pro testování 2,6,9-trisubstituovaných 8-azapurinů. Použity byly linie MCF7 a K562, avšak testy byly provedeny i na jiných druzích buněk, například HOS a G361. Pro vybrané deriváty 8, 11, 16 a 19 (viz obr. 14) byl poté proveden test na panelu 17-ti buněčných linií.^[27]

Látka	IC ₅₀ (μM)		
	CDK2	K562	MCF7
8	1,2	33,1	22,1
11	16,4	21,3	20,2
16	2,8	24,3	18,7
19	1,1	5,7	5,5

Tab. 1 – Biologická aktivita vybraných derivátů 8-azapurinů, připravených doc. Havlíčkem a kol.



Obr. 14 – Vybrané deriváty CDK2 inhibitorů na bázi 8-azapurinového skeletu

3 Výsledky a diskuze

3.1 Syntéza a její optimalizace

Jedním z cílů práce je syntéza a optimalizace metodou využívající 2-kyanoacetamid, cyklopentyl a benzyl azid jako výchozí látky.

V zásadě se schéma zvolené syntézy podobá první cestě obecné přípravy 8-azapurinů vycházející z 1,2,3-1*H*-triazolového cyklu (viz schéma č. 3), až na některé výjimky. V druhém kroku (tj. 1,3-dipolární adice) jsme však izolovali a identifikovali meziproducty 5-amino-1-cyklopentyl-1,2,3-triazolo-4-karboxamid a 5-amino-1-benzyl-1,2,3-triazolo-4-karboxamid. Namísto použití monoesteru kyseliny pro zavedení příslušné substituce a uzavření pyrimidinového kruhu, byl v našem případě použit diethylester kyseliny uhličitě rovněž známý jako „diethyl karbonát“. V důsledku použití tohoto činidla byl obdržen strategický meziproduct pro další derivatizace 9-cyklopentyl - 8-azaxantin a 9-benzyl- 8-azaxantin. Syntetická cesta byla zvolena na základě článku doc.Havlíčka a kol.^[27] (viz schéma č.4.).

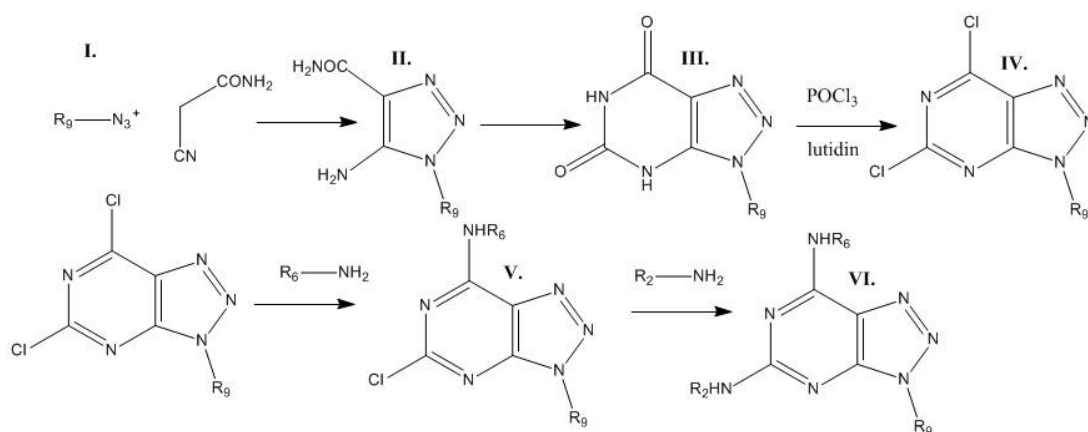


Schéma č.4 - Syntéza 2,6,9- trisubstituovaných 8- azapurinů provedena dle doc.Havlíčka a kol.

V části věnované problematice syntézy byla zaměřena pozornost na optimalizaci jednotlivých kroků a její následný vliv na výtěžky a způsob izolace meziproductů. Následně bylo porovnáno provedení zvolených optimalizací s původním postupem. V neposlední řadě byl taktéž pozorován rozdíl reaktivity meziproductů cyklopentylové a benzylové řady.

3.1.1 Azidace

Cyklopentyl azid (I.)

Samotný cyklopentyl azid, jakožto první krok celé syntézy, byl připraven z azidu sodného a cyklopentyl bromidu. Celá reakce probíhala za laboratorní teploty v DMSO, přičemž se výtěžek pohyboval v rozmezí 79-81%.^[25] Z důvodu uspokojivého výtěžku se reakce obešla bez následné optimalizace.

Benzyl azid (I.)

Podobně jako tomu bylo v cyklopentyllové řadě, dosáhli jsme rovněž v případě benzylové řady uspokojivých výtěžků v intervalu 79-81%, při stejných podmínkách, bez nutnosti optimalizace. Reakce proběhla za použití výchozích látek benzylbromidu a azidu sodného v DMSO.

3.1.2 Cyklizace I.

5-amino-1-cyklopentyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.)

Cyklizace 1,2,3-1*H*-triazolového cyklu substituovaného v pozici 1, v prvním případě cyklopentylem a následně benzylem, se však již neobešla bez optimalizace reakčních podmínek (viz tab. 2)

Optimalizace - Cyklizace I. (5-amino-1-cyklopentyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-karboxamid)					
Báze	Rozpouštědlo	Teplota [°C]	Aparatura	Reakční doba [hod.]	Výtěžek [%]
K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	68	reflux	21	-
MeONa	CH ₃ OH	68	reflux	21	-
MeONa	CH ₃ OH	86	tlaková ampule	21	8
EtONa	EtOH	86	tlaková ampule	21	35
Na/EtOH	EtOH	86	tlaková ampule	21	39
t-BuOK	t-BuOH	86	tlaková ampule	21	55

Tab. 2 – Optimalizace cyklizace I.

Na cyklopentyllové řadě derivátů byly ověřeny celkem čtyři báze. Z ekonomického hlediska se zdály být nejvhodnější uhličitan draselný a methanolát sodný. Mezi další výhody těchto bází patří bezesporu použití v bezvodém methanolu. Nicméně, po několika experimentech, ať už za použití varné baňky (reflux), či tlakové ampule již bylo zřejmé, že pro tuto reakci nejsou vhodné.

Poté jsme reprodukovali postup doc. Havlíčka a kol. ^[27] tj. použití ethanolátu sodného, který se po dlouhou dobu zdál být vhodný. V postupu doc. Havlíčka, byl použit ethanolát sodný připravený rozmícháním sodíku v bezvodém (absolutním) ethanolu těsně před reakcí, dále byla celá reakční směs refluxována po dobu jednadvaceti hodin.

V našem případě jsme použili komerční ethanolát a později i ethanolát připravený těsně před reakcí. V druhém případě se oproti reprodukované proceduře (použití refluxu), ukázal značný potenciál aplikace tlakové ampule. Zajímavé srovnání nám poskytla reakce čerstvě připraveného ethanolátu, jímž jsme zvýšili výtěžek o 4 %.

Po dlouhou dobu byly výtěžky dosažené ethanolátem sodným brány jako dostatečné, neboť z hlediska syntézy byl kladen důraz na vytvoření prvního koncového derivátu. Nicméně i tato optimalizace měla značné nedostatky, a to nejen z důvodu nutnosti aplikace větších násad.

Největším z nich byla neefektivní extrakce meziprojektu do ethylacetátu, kdy docházelo k úbytkům výtěžku.

Jako elegantní řešení vzniklého problému se ukázalo použití báze terc-butanolátu draselného, kde i samotná reakce probíhala v heterogenní fázi. Izolace meziprojektu se pak znatelně zjednodušila. Stačila již pouhá filtrace, při které bylo získáno majoritní množství meziprojektu již v prvním podílu. Následnou extrakcí bylo získáno další množství triazolokarboxamidu i v druhém podílu. Izolované podíly meziprojektu se podařilo získat ve vysoké čistotě a to bez větších ztrát oproti předchozí metodě. Jednoduchost izolačních operací - tj. odpaření rozpouštědla, vysrážení produktu vodou, konečné zfiltrování pod vakuem (první podíl) a extrakce druhého podílu, se ukázala být hlavní výhodou této metody. Jak je patrné z tab. 2, výtěžek dosažený za použití terc-butanolátu se zvýšil o 16%, oproti výsledku za použití ethanolátu sodného připraveného těsně před reakcí (39%).

I přesto, že se výtěžek 55% může zdát být nedostatečně uspokojivý, jedná se však o průlomové provedení tohoto syntetického kroku. I při větších násadách došlo k efektivnějšímu zpracování reakční směsi a k větší výtěžnosti ve srovnání s předchozími postupy.

5-Amino-1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.)

Jak již bylo zmíněno dříve, pro optimalizace na cyklopentylové řadě byl jakožto startovní báze vybrán ethanolát sodný. Daná báze byla využita rovněž pro optimalizaci na benzylové řadě. Za těchto podmínek cyklizace I probíhala již za laboratorní teploty. Téměř okamžitě po přidání benzyl azidu, se reakční směs zbarvila z původní bílé na žlutou barvu. Zmíněná reaktivita benzyl azidu byla již popsána v publikaci (Kislyi, V.P.; Danilova, E. B.; Semenov, V. V.; *Russian Chemical Bulletin*, 2003, 52, 1770-1776). Syntéza meziprojektů v benzylové řadě vykazovala větší reaktivitu oproti řadě cyklopentylové. Pro značný výtěžek (69%) a jednoduchost izolačních operací (tj. filtrace 1. podílu a extrakce 2. podílu), nebylo v případě uvedených derivátů třeba přistoupit k následným optimalizacím.

3.1.3 Cyklizace II.

3-Cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin 5,7(4H,6H)-dion (III.)

Cyklizace II se stala bezesporu nejefektivnějším krokem celé syntézy. Její původní provedení využívá reakce substituovaného 1,2,3 – 1H – triazolo – 4 – karboxamidu s diethylesterem kyseliny uhličitě a báze ethanolátu sodného (připraveného před reakcí) v absolutním ethanolu, za použití varné baňky pod zpětným chladičem (reflux).

Optimalizace - Cyklizace II. (3-cyklopentyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion)							
Báze	EtONa					MeONa	t-BuOK
Ekvivalent báze	4,6	3	4,5	5	5	5	5
Ekvivalent Et ₂ CO ₃	1,5	2	2	2	3	3	3
Rozpouštědlo	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	EtOH	MeOH	t-BuOH
Teplota [°C]	78	86-96	85-90	85-90	92	92	100
Aparatura	reflux	tlak. amp.	tlak. amp.	tlak. amp.	tlak. amp.	tlak. amp.	tlak. amp.
Reakční doba [hod.]	4,5	4,5	21	21	21	21	21
Výtěžek [%]	-	-	35	44	34,5	-	64

Tab. 3 – Optimalizace cyklizace II.

Krok cyklizace II. se stal pomyslným vrcholem optimalizací v rámci celé syntézy 8-azapurinů. Důvodů je hned několik. V porovnání s první serií optimalizací provedené na cyklizaci I., jsme věnovali pozornost detailnějšímu zkoumání vlivu použití a provedli nejružnější druhy úprav reakčních podmínek (změny použité báze a množství báze, sledování teplotní závislosti, změny použité aparatury apod.) mající vliv na průběh samotné reakce a výtěžek.

Zprvu jsme provedli reprodukci původního postupu popsaného doc. Havlíčkem a kol.^[27], nicméně za použití komerčního ethanolátu sodného (první sloupec, metoda EtONa). Nicméně se tento postup nepodařilo zreprodukovat. Původní procedura zahrnuje použití varné baňky pod zpětným chladičem, za poměrně nízké teploty a reakční doby, a množství výchozí látky (diethyl esteru kyseliny uhličitě). Ovlivnění těchto faktorů sehrálo významnou roli z hlediska efektivnějšího provedení daného kroku a vyššího výtěžku 9-cyklopentyl-8-azaxanthinu.

Jak je patrné z tab. 3, strategie optimalizace cyklizace II. byla ze začátku zaměřena na zvýšení množství výchozí látky diethyl karbonátu, použití tlakové ampule a snížení množství

báze (druhý sloupec, metoda EtONa). Daný postup se však ukázal jako nepříliš efektivní i přesto, že produkt byl v reakční směsi prokázán, avšak pouze v malé koncentraci. Domnívali jsme se tedy, že prodloužení reakční doby a zvýšení množství báze by mohlo vést k tvorbě většího množství produktu. Úprava reakčních podmínek (3. sloupec, metoda EtONa), se ukázala jako velmi užitečná, navíc se meziprodukt 9-cyklopentyl-8-azaxanthin podařilo izolovat ve vysoké čistotě s poměrně velkým výtěžkem. Z pokusu je patrné, že v rámci cyklizační reakce je důležitá násada většího množství báze, delší reakční čas a v neposlední řadě zde sehrála značnou roli i použitá aparatura. Schéma reakčních podmínek se pro překvapivý výsledek ponechalo i do dalšího experimentu. Jak bylo již zmíněno, báze sehrála v reakci zcela zásadní roli, proto se v následném experimentu zvýšila o půl ekvivalentu ethanolátu sodného (čtvrtý sloupec, metoda EtONa). Již nepatrné navýšení báze vedlo k přírůstku výtěžku o 9%. Jednalo se o nejlepší optimalizaci reakčních podmínek, provedenou na cyklizaci II v rámci EtONa metody. V souvislosti s danou metodou, jsme upozorovali vliv zvýšení množství diethyl karbonátu (čtvrtý sloupec, metoda EtONa) a teploty na výtěžek reakce. Jak je však patrné z tab. 3, kýženeho výsledku nebylo dosaženo.

Významu teploty pro reakci, jsme v rámci několika experimentů věnovali značnou pozornost. V jednom z experimentů se podařilo vysledovat zvyšování koncentrace produktu, metodou tenkovrstvé kapalinové chromatografie, v závislosti na teplotě. Při nižších teplotách nebyl produkt téměř prokázán ($T=55^{\circ}\text{C}$, reakční doba = 21 hod., metoda EtONa – 5. sloupec, mobilní fáze CHCl_3 : MeOH, stacionární fáze nemodifikovaný silikagel). Zajímavé výsledky však byly zaznamenány při TLC analýze po zvýšení teploty na 95°C , po dobu 3 hodin a 40 minut, kdy se koncentrace produktu výrazným způsobem zvýšila.

Při zpracování reakční směsi bylo oproti původnímu postupu využito určitých úprav (přidání vody do reakční směsi (ochlazená na laboratorní teplotu), úpravy pH na hodnotu $\text{pH}\sim 6$, následného odpaření do minimálního objemu, poté zfiltrování surového produktu a konečné rekrystalizace v methanolu). V důsledku vhodné úpravy zpracování reakční směsi, jsme mohli produkt izolovat ve vyšší čistotě (úprava se týkala pouze metody EtONa). Jednalo se především o určitá zjednodušení. Úprava hodnoty pH byla provedena již bez přidání vody do reakční směsi, kdy se produkt kvantitativně vysrážel. Takto vysrážený produkt nebylo těžké filtrovat. Odfiltrovaný produkt bylo nutné separovat od kontaminujících solí, proto jsme jej rozpustili v menším množství vody. Hodnota pH vody se pochopitelně zvýšila až k hodnotám $\text{pH}\sim 8$, po okyselení došlo k druhému vysrážení produktu, nicméně zbaveného kontaminujících solí. Jak jsme si ověřili dle TLC analýzy, tímto postupem jsme eliminovali případné ztráty 9-cyklopentyl-8-azaxanthinu v matečném louhu, což byla hlavní nevýhoda původní procedury^[26].

Dle předchozích zkušeností a pozorování získaných při syntéze pomocí ethanolátu sodného, se nabízela ještě jedna úprava podmínek reakčního kroku, a to změna báze. Pro další experimenty našly uplatnění báze methanolát sodný a terc-butanolát draselný. V prvním případě tj. při nasazení methanolátu sodného došlo sice k tvorbě produktu, nicméně ve velmi malé koncentraci.

Zásadní průlom přišel za použití báze terc-butanolátu draselného. Celá reakce probíhala s menšími změnami tj. teplota zvýšena na 100°C, za podobných podmínek jako výše zmíněné optimalizace provedené na metodě EtONa. V případě báze terc-butanolátu draselného se značným způsobem zjednodušilo zpracování reakční směsi a zároveň se zvedl výtěžek téměř na dvojnásobek, tedy 64%. I přesto, že se výtěžek může zdát nepříliš velký, jedná se zatím o nejlepší možné provedení v porovnání s EtONa metodou, což dokládají i provedené experimenty na benzylové řadě derivátů.

3-benzyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion (III.)

Nalezené nejvhodnější optimalizace provedené již na cyklopentylové řadě prokázaly velkou účinnost i na řadě benzylové. Konečný dosažený výtěžek 92% nám poskytl přímé porovnání s původní procedurou citovanou doc. Havlíčkem a kol.^[27] V původním postupu byl k cyklizaci použit ethanolát sodný, připravený ze sodíku v ethanolu těsně před reakcí, výsledný výtěžek se pohyboval kolem 83%. Metoda využívající t-BuOK se proto stala nejpoužívanějším postupem pro přípravu 9-substituovaných 8-azaxanthinů.

3.1.4. Chlorace

5,7-dichloro-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin (IV.)

3-benzyl-5,7-dichloro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin (IV.)

Chlorace 9-substituovaného 8-azaxanthinu, provedená doc. Havlíčkem a kol.^[27] se při porovnání s námi zvoleným postupem do značné míry liší. Avšak určitá analogie rozdílů chování dvou řad derivátů, byla pozorována v obou případech.

Rozdílné chování dvou řad derivátů popsané doc. Havlíčkem a kol. se týkalo isopropylové a benzylové řady.^[27] Zatímco isopropylová řada vykazovala vysokou nestabilitu, benzylová řada prokázala vyšší reaktivitu a tendence k vykrytalizování produktu z reakční směsi. Tento zásadní rozdíl ve stabilitě hrál velkou roli při izolaci meziproductů *5,7-dichloro-3-isopropyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidinu* a *5,7-dichloro-3-benzyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidinu*. Připraveny byly za použití báze 2,6-lutidinu, $POCl_3$ a příslušných 9-substituovaných 8-azaxanthinů. Izolace dichlor derivátů, proběhlo formou extrakce do benzenu, či chloroformu při 0°C, kdy benzylový dichlor derivát měl spíše tendenci krystalovat, oproti tomu isopropylový derivát spíše inklinoval k destabilizaci, proto byl okamžitě nasazen do dalšího stupně syntézy.^[27] Podobné chování jsme pozorovali i v rámci naší syntézy, na řadě cyklopentylové a benzylové.

Na cyklopentylové řadě jsme doposud využili tři metod chlorace. První vychází z použití dichloridu kyseliny fenylfosfonové,^[27] druhá z použití trichlorid fosforylu /triethyl aminu a třetí využívá pouze trichlorid fosforylu. Na přípravu benzylové řady dichlor derivátu, našla z časového hlediska uplatnění pouze druhá metodika.

V námi zvolené metodice syntézy jsme nepoužili původní postup, důvodů bylo hned několik. Jedním z nich byl velmi nízký výtěžek (20-25%) a nereprodukovatelnost metody ve větších násadách (pouze do 2 gramů). Dále tato metoda neumožňuje spolehlivou separaci čistého dichlor derivátu, a je proto nutné surový produkt použít v dalším stupni. Naproti tomu první metoda dichloridu kyseliny fenylfosfonové nabízela vysoký výtěžek. Ovšem i zde přetrvával problém s kontaminací a delší reakční dobou (24 hod). Kontaminantem byla kyselina fenylfosfonová, která byla odstraněna ze surového produktu sloupcovou chromatografií. Vzhledem k vysokému výtěžku, který činil i po purifikaci 78% je však zřejmé, že daný nedostatek nijak neovlivnil použitelnost metody. Případné optimalizace purifikačních operací reakční směsi jsou předmětem budoucí práce.

Historicky druhá metoda ($POCl_3$ s Et_3N), našla poměrně značné uplatnění v rámci větších násad, čímž vhodně doplnila chybějící místo v rámci chloračních metod. Menší nevýhodu však nalezneme i této metodě, čímž je dosažení nižšího výtěžku v porovnání s předchozím postupem. Regenerovatelnost trichloridu fosforylu ($POCl_3$), ekonomická a časová nenáročnost (4,5 – 24 hod.) a v neposlední řadě také jednoduchost separační procesů, jsme shledali jednoznačnými výhodami metodiky $POCl_3/Et_3N$. Při přípravě dichlór derivátů tímto způsobem, se operace izolace zjednodušily pouze na extrakci do dichlormethan, dále pak do diethyletheru a následné rekrystalizace z methanolu. I po rekrystalizaci jsme dostali uspokojivého výtěžku 43% v cyklopentylové řadě a 78% v řadě benzylové. Navíc se metodika přípravy tímto způsobem dala využít i při nasazení většího množství výchozí látky (více jak 2 gramy), což v případě první metody bylo poměrně náročné na zpracování. I rozklad reakční směsi při vyšších násadách nebyl v zásadě velkým problémem, neboť trichlorid fosforylu lze velice jednoduchým způsobem regenerovat destilací. Reakční směs, obsahující minimální množství $POCl_3$, se poté vmíchala do ledové vody a tím bylo zamezeno nežádoucí prudké exotermní reakci. Izolace proběhla v totožném sledu operací, jaké jsou popsány výše.

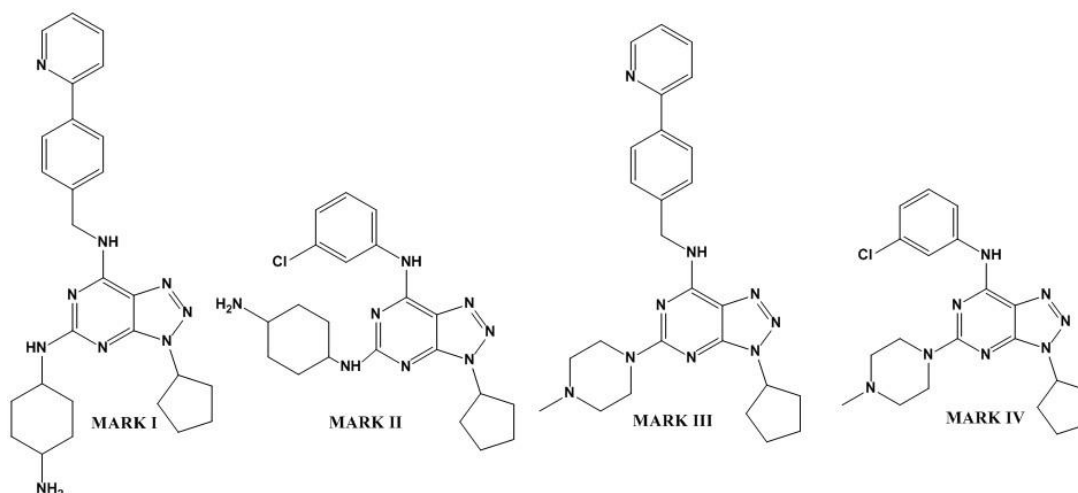
Poslední odzkoušená metodika, tedy metoda $POCl_3$, bez použití jakékoliv báze, nám poskytla velice zajímavý náhled na reaktivitu pozice C6 a pozice C2 (dle purinového číslování). Schéma podmínek této metody se od předchozí metody, nikterak neliší. Zaměřili jsme se pouze na pozorování vlivu nepřítomnosti báze a reaktivitu jako takovou. Zajímavé zjištění přišlo po izolaci dvou složek obsažených v reakční směsi, jednalo se o výchozí látku 9-cyklopentyl-8-azaxanthin a 6-chlor-9-cyklopentyl-8-azahypoxanthin. Experiment ukázal, že karbonylová skupina na pozici C6 je dostatečně reaktivní vůči nukleofilnímu ataku, proto na syntézu monochlor derivátu není třeba užití báze. Bohužel však byla tato metoda z časových důvodů vyzkoušena jen na cyklopentylové řadě derivátů. Použití samotného $POCl_3$, se neukázalo být užitečným postupem pro syntézu 2,6,9-trisubstituovaných 8-azapurinů, ale může být naopak využito pro regioselektivní chloraci na derivátech 8-azaxanthinu.

3.1.5 Derivatizace (V.) a (VI.)

V námi zvolené strategii syntézy sehrály optimalizace hlavní roli v předchozích krocích, při přípravách klíčových intermediátů. V posledních dvou krocích tj. nukleofilní substituce na pozici C6 (V.) a C2 (VI.), nebyla využita metodika pocházející z reakčního schématu doc. Havlíčka a kol.^[27], nýbrž postup převzatý z již připravené řady 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinů.^[29]

Oba derivatizační kroky, byly doposud využity pro přípravu čtyř koncových derivátů pouze v řadě cyklopentylové. Dále tyto čtyři deriváty můžeme rozdělit na dvě dílčí řady dle použití substituce v poloze C6, a to řadou inspirovanou bioisosterní sloučeninou CR8 a řadou odvozenou od bioisosterního Purvalanolu A. Předposlední stupně (IV.) C6 substituované deriváty, byly připraveny reakcí příslušného aminu, báze *N, N'*-diisopropyl-*N*-ethylaminu v propanolu, za použití tlakové ampule a teploty kolem 100°C.^[29] Tímto způsobem navržené schéma reakce se ukázalo být velmi efektivní, reprodukovatelné a s dobrými výtěžky pohybující se kolem 44-91 %.

Jak je patrné z předchozí kapitoly, rozdílu v reaktivitě pozice C2 a C6 může být využito vhodnou volbou reakčních podmínek, jiné tomu nebylo ani v případě nukleofilní substituce v poloze C2. Oproti předchozímu postupu tj. obsazení C6 polohy vhodným aminem, probíhala finální derivatizace v pozici C2 za vysoké teploty (160°C) výchozí látky IV. a příslušného aminu. Výtěžky posledního kroku se pohybovaly v intervalu 45-86 %, s nízkou náročností izolačních operací. Během celé syntézy se s velkým úspěchem uplatnila metoda vysrážení meziproductů i cílových derivátů vodou, resp. krystalizace nicméně v některých případech, kdy již byly vyčerpány možnosti takového způsobu izolace, přišla z časových důvodů na řadu purifikace přes sloupcovou chromatografii. Pro tuto práci byly připraveny koncové deriváty s označením MARK I, MARK II, MARK III a MARK IV (viz obr. 4) Volba použitých substitucí bude dále prodiskutována v následující kapitole.



Obr. 15 – Koncové deriváty cyklopentylové řady (MARK I-IV)

3.2 Biologická aktivita koncových derivátů

Hlavními cíli práce bylo nejen optimalizovat navržený koncept celé syntézy, ale také připravit několik koncových derivátů s potenciální biologickou aktivitou. Důraz kladený na efektivnost použitých substitucí (viz kapitola Purinové CDK- inhibitory) zakomponovaných do 8-azapurinového skeletu výrazným způsobem ovlivnil celkovou CDK2-inhibiční a proliferační aktivitu nádorových buněčných linií K-562 a MCF7.

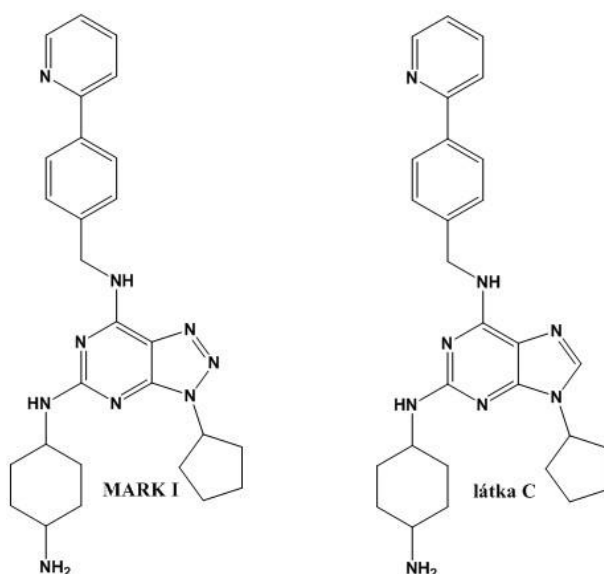
Jednalo se v zásadě o sérii dvou druhů testů, z nichž první byl uskutečněn na komplexu CDK2/cyklin E tzv. kinasový inhibiční test. Pro testování anti-proliferačních účinků (cytotoxicity) daných látek byly vybrány buněčné linie rakoviny prsu – MCF7 a leukemická K-562.

Výstupem provedených testů se pak stala hodnota IC_{50} . Koncentrace inhibitoru, která způsobí pokles aktivity enzymu o 50%, pak odpovídá zmíněné hodnotě. Někdy lze u testů na buněčných liniích pozorovat dva projevy inhibice. Prvním z nich je zastavení buněčného cyklu, což se projeví zastavením proliferace buněk. V případě druhého projevu dochází k buněčné smrti tzv. apoptóze.

Code	IC ₅₀ (μM) CDK2	Cytotoxicita (μM)	
		K562	MCF7
MARK I.	1,089	2,28	2,9
MARK II.	1,520	2,64/2,49	4,23/5,41
MARK III.	12,632	14,12	26,11
MARK IV.	9,327	3,34	43,81

Tab. 4 – Hodnoty IC₅₀ pro připravené deriváty 2,6,9-trisubstituovaných 8-azapurinů

Jak je dobře patrné z tab. 4 nově nasyntetizované deriváty 8-azapurinů se výrazným způsobem liší o parentní skupiny purinových CDK-inhibitorů. Výrazný pokles aktivity je velice patrný. Příkladem může být srovnání látek MARK I. a purinového analogu - látky C (viz obr. 16). Kdy k inhibici a poklesu aktivity o 50% CDK2/cyklinu E docházelo již při koncentracích 0,017 μM. Následně i testy cytotoxicity hovoří v prospěch purinové řady, kdy byl zaznamenán anti-proliferační účinek při koncentracích 0,05 μM (K-562) a 0,039 μM (MCF7).^[50]



Obr. 16 – deriváty MARK I. a látka C

Porovnání látek MARK II. a látky 19 připravené doc. Havlíčkem a kol. potvrzuje významnou roli použitých substituentů, ve zmíněném případě se jednalo o záměnu N9 - isopropylového substituentu za cyklopentylový. Hodnota IC₅₀ v inhibici CDK2 se výrazným způsobem nezměnila. Obrat však nastal při stanovení hodnot cytotoxicity, kde cyklopentylový

substituent v pozici N9 způsobil zvýšení selektivity MARK II ve prospěch linie K-562 oproti látce 19 (cytotox. K-562 = 5,7 μ M).

Nejdůležitějším faktem však zůstává odlišnost koncentrací použitých k inhibici CDK2 a hodnot cytotoxicity. Naznačuje, že anti-proliferačnímu efektu dochází skrze jiné enzymy, proto bude v rámci budoucí práce věnována pozornost na detailní analýzu vazeb těchto derivátů v rámci buněčného systému a případného návrhu efektivnější derivátů 2,6,9-trisubstituovaných 8-azapurinů.

4 Experimentální část

4.1 Analytické metody

Čistota meziproductů, productů, i samotné průběhy některých reakcí, byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie – TLC na hliníkových pokrytých silikagelem 60 WF 254 (Merck KGaA).

Vizualizace TLC desek s nanesenými vzorky byla zprostředkována pomocí UV lampy (Camag) s vlnovými délkami délce λ 254 nm nebo 366 nm. Na určení teplot tání byl použit bodotávek Büchi B-540.

Získaná spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla naměřena pomocí Bruker Avance AV 300 spektrometru při frekvenci 300 MHz (1H) a 75MHz (13C) nebo na Jeol 500 MHz (1H) a 125 MHz (13C). V rámci měření se nejčastěji využívala rozpouštědla DMSO- d^6 a $CDCl_3$.

Hmotnostní spektra byla změřena na hmotnostním spektrometru Waters ZMD 2000 s využitím pozitivní ionizace elektrosprejem. Detekce snímání kladných iontů probíhala ve full scan módu v rozmezí m/z 50-800 Da.

4.2 Použité chemikálie

V průběhu syntézy nových 2,6,9-trisubstituovaných derivátů 8-azapurinů byly použity tyto chemikálie: Azid sodný, cyklopentyl bromid, benzyl bromid, 2-kyanoacetamid, diethyl ester kyseliny uhličitě, trichlorid fosforylu, dichlorid kyseliny fenyl fosfonové, triethyl amin, N,N'-diisopropyl ethylamin (DIPEA), 3-chloroanilin, trans-1,4-diaminocyklohexan, N-methylpiperidin, sodík, uhličitan draselný, methanolát sodný, ethanolát sodný, terc-butoxid draselný zakoupené od firmy Sigma Aldrich.

Z rozpouštědel: methanol, ethanol, aceton, isopropanol, n-propanol, terc-butanol, diethyl ether, petroleum ether, ethyl acetát, hexan, toluen, voda, chloroform, dichlormethan (DCM), kyselina octová (98%) zakoupená od firmy Lachner. Nasycený roztok NaCl, $NaHCO_3$ a (4-(pyridin-2-yl)fenyl)methanamin dihydrochlorid byly připraveny v Laboratoři růstových regulátorů v Olomouci.

4.3 Metody

4.3.1 Příprava Cyklopentyl azidu (I.)

Do připraveného roztoku azidu sodného (35,75g, 0,55 mol v 500ml DMSO) bylo přidán cyklopentyl bromid (53,6 ml, 0,5 mol). Reakce probíhala za laboratorní teploty, při kontinuálním míchání, po dobu 9 hod. Následné přidání menšího množství ledové vody a Et₂O umožnilo rozdělení reakční směsi na dvě fáze. Postupnou extrakcí do Et₂O a opatrným odpařením do minimálního objemu, byla získána olejovitá kapalina. Izolační operace a samotné skladování vyžadovalo z důvodů nestability a výbušného charakteru látky zamezení jakékoli delší expozice slunečního záření, výkyvům teplot a kontaminace kyselinami či halogenovanými rozpouštědly.

Výtěžek: 42,8 g, 77%;

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.59 – 1.86 (m, 8H), 3,93-3,96 (m, 1H).

4.3.2 Příprava Benzyl azidu (I.)

Užitý postup přípravy benzylového intermediátu byl analogický jako v předchozím kroku.

Vycházel však z *benzyl bromidu* (17,84 ml, 0,15 mol) a roztoku *azidu sodného* (11g, 0,168 mol v 300ml DMSO). Mnohokrát využitá procedura izolace cyklopentyl azidu byla uplatněna i v tomto případě.

Výtěžek: 20,3 g, 79%;

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.35 (s, 2H), 7,24 - 7.48 (m, 5H).

4.3.3 Příprava 5-Amino-1-cyklopentyl-1H-1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.)

Tlaková ampule obsahující suspenzi 63ml t-BuOH a t-BuOK (4,5 g, 0,04 mol), byla rozmíchána společně s přídatkem 2-kyanoacetamid (3,67g, 0,04mol). Do takto vytvořené reakční směsi byl za laboratorní teploty napipetován cyklopentyl azid (4,38g, 0,039mol). Samotná reakce pak probíhala za postupného zvyšování teploty až na 86°C. Při požadované teplotě se pak směs výchozích látek míchala po dobu 24 hod. Ze zahuštěné reakční směsi se po přidavku malého množství vody stala suspenze bílé vysrážené látky, která byla poté zfiltrována. Získaný a vysušený první podíl tvořil majoritní podíl na celkovém výtěžku. Překvapivě ani doextrahování druhého podílu z matečného louhu, pomocí EtOAc nesnížilo čistotu získaného intermediátu. V obou případech byla izolována bílá krystalická látka.

Výtěžek: 4,3 g, 55%; t.t.: 203– 204 °C;

¹H NMR (300MHz, DMSO) δ ppm: 1.61 –2,09 (m, 8H), 4,61 - 4,70 (m, 1H);

HPLC-MS:[ESI+] = 196,17

4.3.4 Příprava 5-Amino-1-benzyl-1H-1,2,3-triazolo-4-karboxamid (II.)

Do roztoku rozpuštěného sodíku (3,23g, 0,14 mol) v 190 ml EtOH byl za stálého míchání přidán 2-kyanoacetamid (11,83g, 0,14 mol). Vytvořená bílá suspenze se po přidavku benzyl azidu (18,2g, 0,13 mol) zbarvila dožluta. Celá reakční směs zvolna zahřívána až na 90° byla míchána při této teplotě do druhého dne. Po uplynutí reakční doby se vyloučil první podíl, který byl snadno filtrovatelný. Druhý podíl získaný zahuštěním na RVO a vysrážením vodou, pak zvýšil celkový výtěžek reakce bez vlivu na čistotu izolované látky.

Výtěžek: 20,5g, 69 %; t.t. = 236 - 237, °C;

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ ppm: 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 5.38 (s, 2H);

HPLC-MS [ESI+] = 217, 8

4.3.5 Příprava 3-Cyklopentyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion (III.)

Po rozmíchání suspenze 5-Amino-1-cyklopentyl-1H-1,2,3-triazolo-4-karboxamidu (2,05g, 0,010mol), *t*-BuOK (5,9g, 0,053mol v 150 ml *t*-BuOH) byl připipetován diethylester kyseliny uhličitě (3,8 ml, 0,032 mol). Celá reakce probíhala při 100°C po dobu 21 hod. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu a úpravě pH na hodnotu 6, došlo ke kvantitativnímu vyloučení produktu. Celá reakční směs byla po přidavcích vody a EtOH zahuštěna na RVO. Ke konečnému vyloučení produktu došlo po přidání vody k odparku. Vzniklou suspenzi již bylo možné snadno filtrovat.

Konečný výtěžek po zfiltrování a vysušení činil: 1,5g ,64%;

t.t.: 293 – 294 °C;

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 1,65-2,13 (m, 8H), 4,90-4,94 (m, 1H), 11,19 (s, 1H), 12,30 (s, 1H);

HPLC-MS [ESI+] = 222, 1

4.3.6 Příprava 3-Benzyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dion (III.)

Metodika přípravy benzylového meziprojektu se v zásadě nelišila od přípravy cyklopentylového intermediátu. Vycházel z 5-Amino-1-benzyl-1H-1,2,3-triazolo-4-karboxamidu (2g, 0,009mol), *t*-BuOK (5,16g, 0,046mol) a diethylesteru kyseliny uhličitě (3,35ml, 0,027mol) v 45 ml *t*-BuOH.

Výtěžek: 2,0 g, 92%; t.t.: 288-289°C;

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ ppm: 5,50 (s, 2H), 7,15-7,42 (m, H), 10,75 (s,1H);

HPLC-MS [ESI+] = 243,8

4.3.7 Příprava 5,7-Dichloro-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin (IV.)

Do suspenze 3-Cyklopentyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dionu (1g, 0,004 mol) a $POCl_3$ (20,63 ml, 0,94 mol) byl přidán Et_3N (1,14 ml, 0,009 mol). Celá reakce probíhala v teplotním intervalu 130-150°C po dobu 24hod. Po dokončení reakce následoval rozklad reakční směsi v ledové vodě a ledu. Meziprodukt IV. vyextrahovaný do CH_2Cl_2 , následně do Et_2O a poté odpařený na RVO byl překrystalizován v MeOH. Po zfiltrování byl získán produkt ve formě viskózní olejovité kapaliny s tendencemi vytvářet drobné krystalky.

Výtěžek: 0,5 g, 43 %;

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm: 1,77-2,40 (m, 8H), 5,23 - 5,35 (m, 1H);

HPLC-MS [ESI+] = 257,2

4.3.8 Příprava 3-Benzyl-5,7-dichloro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidine (IV.)

Postup analogický jako v předchozím případě, vycházející z 3-Benzyl-3,4-dihydro-5H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7(6H)-dionu (2g, 0,008 mol), $POCl_3$ (38, 32ml, 0,411 mol) a Et_3N (2,3 ml, 0,016 mol). Izolovaný meziprodukt, byl použit okamžitě k derivatizaci.

Výtěžek: 1,8g , 78%,

1H NMR (500MHz, DMSO) δ ppm: 5.82 (s, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 5H).

4.3.9 Příprava 5-Chloro-3-cyklopentyl-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (Va.)

Reakční směs meziproduktu IV. cyklopentylové řady (0,31g, 0,001mol), (4-(pyridin-2-yl)phenyl) methanamin dihydrochlorid tzv. CR8 aminu (0,31g, 0,001mol) a DIPEA (1,46ml, 0,008mol) v 4,1 ml n-propanolu byla refluxována po dobu 4,5 hod. Po uplynutí reakční doby byl zfiltrovaný první podíl produktu promyt n-propanolem a vodou. Druhý podíl izolovaný pomocí extrakce do EtOAc a zahuštěný na RVO, byl získán v HPLC čistotě >97%. Proto mohl být použit i v dalším kroku.

Výtěžek: 0,44 g, 90%; t.t.:204-205°C

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 1,17-1,86 (m, 2H), 2,03-2,04 (m, 2H), 2,21-2,29 (m, 4H), 4,96 (d, $J = 9,7$ Hz, 2H), 5,18-5,28 (m, 1H), 5,43 (d, $J = 10,95$ Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 7,52 (d, $J = 13,45$ Hz, 2H), 7,73-7,81(m, 2H), 8,016 (d, $J = 13,45$ Hz, 2H), 8,71(d, $J = 6,65$ Hz, 1H);

HPLC-MS[ESI+] = 405,1

4.3.10 Příprava 5-Chloro-N-(3-chlorfenyl)-3-cyklopentyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (Vb.)

Suspenze meziprojektu **IV**. (0,268g, 0,001mol), 3-chloranilinu (0,132g, 0,001mol) a DIPEA (0,889 ml, 0,005mol) v n-propanolu (4,46 ml) byla míchána při teplotě 100°C po dobu 4,5 hod. Ochlazením RS a následným zahuštěním na RVO bylo možné kvantitativně vysrážet vzniklý produkt z reakční směsi pomocí přídavku vody. Ze vzniklé suspenze byl produkt odfiltrován a vysušen při 60°C.

Výtěžek: 0,33g, 91%; t.t.: 128-129°C;

¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ ppm: 1,67– 1,79 (m, 2H), 1,89 – 2,02 (m, 2H), 2,11 – 2,29 (m, 4H), 5,20 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H), 7,12 (dd, *J* = 7,9, 1,0 Hz, 1H), 7,29 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,67 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,85 (s, 1H), 8, 72 (s, 1H);

HPLC-MS [ESI+]= 350, 7

4.3.11 Příprava N⁵-(4-Aminocyklohexyl)-3-cyklopentyl-N⁷-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-5,7-diamin(VI. – MARK I.)

Směs meziprojektu **Va**.(0,20g, 0,49mmol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (0,84g, 7,36 mmol) byla za vysoké teploty (160°C) tavena. Po 4,5 hodinách následovalo ochlazení RS na laboratorní teplotu s postupnými přídavky vody a EtOAc. Vyextrahovaný a odpařený produkt však nesplňoval požadovanou čistotu (HPLC čistota > 97%) pro biologické testování, proto byl produkt rekrystalován z Et₂O.

Výtěžek: 0,160 g, 65%; t.t.: 119-120°C

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 1,15-1,34 (m, 4H), 1,75 (t, *J* = 9,45Hz, 2H), 1,84-1,92 (m, 5H), 2,01-2,06 (m, 2H), 2,14-2,24 (m, 6H), 2,71 (s, 1H), 3,78-3,80 (m, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,91 (s, 1H), 5,05 (s, 1H), 7,20-7,25 (m, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 1,61Hz, 2H), 7,69-7,77 (m, 2H), 7,96 (d, *J* = 1,61Hz, 2H), 8,69 (d, *J* = 0,94Hz, 1H);

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 24,80, 24,81, 31,89, 31,91, 32,40, 32,44, 35,25, 35,31, 44,02, 50,11, 50,20, 58,27, 120,57, 122,15, 122,28, 127,20, 127,25, 128,06, 128,14, 136,87, 138,56, 139,44, 149,70, 149,79, 150,88, 154,74, 157,13;

HPLC-MS [ESI+] = 483, 3

4.3.12 Příprava *N*⁵-(4-Aminocyklohexyl)-*N*⁷-(3-chlorfenyl)-3-cyklopentyl-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pyrimidin-5,7-diamin (VI. – MARK II.)

Směs výchozích látek **Vb.** (0,43g, 0,001mol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexan (2,1g, 0,018mol) byla po dobu 4,5 hod, zahřívána při teplotě 160°C. Přídavek malého množství vody do ochlazené reakční směsi iniciovalo vylučování surového produktu, který však bylo možné po delší době krystalizace snadno filtrovat.

Zfiltrovaný, surový produkt rozpuštěný v minimálním množství DCM, byl rozmíchán ve směsi křemeliny a aktivního uhlí, a poté opět zfiltrován.

Filtrát zahuštěný na RVO s malým přídavkem Et₂O byl ponechán krystalovat. Získaný produkt nesplňoval parametry pro biologické testy tj. HPLC čistota > 97%. Surový produkt po přídavku EtOAc vytvořil suspenzi, která byla refluxována. Po ochlazení a přídavku DCM přešla suspenze v roztok. Po zahuštění roztoku na RVO a následných přídavcích EtOAc došlo vylučování látky MARK II, proto byla celá směs ponechána krystalovat přes noc. Rekrystalizovaný první podíl splnil požadavky na HPLC čistotu. Druhý podíl vyizolovaný a přečištěný pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: 9:1 CHCl₃ : MeOH, stacionární fáze: nemodif.silikagel) z matečného louhu činil pouze minoritní příspěvek k celkovému výtěžku, proto byl použit k identifikaci látky.

Výtěžek: 0,230 g, 44%; t.t.: 193-194°C,

¹H NMR (500MHz, DMSO) δ ppm: 1,58 -2,18 – (m, 19H), 4,86 – 5,01 (m, 1H), 5,01-5,13 (m, 1H), 7,07 (dd, *J* = 17,2, 7,5 Hz, 1H), 7,23 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7,40 – 7,26 (m, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,14 – 8,02 (m, 1H), 8,29 (s, 1H);

¹³C MR (125 MHz, DMSO) δ ppm: 25,14, 25,16, 30,72, 30,74, 31,26, 31,29, 32,20, 32,23, 49,55, 49,64, 119,49, 119,72, 121,10, 122,95, 130,56, 122,41, 141,56, 151,10, 151,67, 152,47

HPLC-MS [ESI+] = 426,8

4.3.13 Příprava 3-Cyklopentyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amin (VI. - MARK III.)

Do malé kyvety (5ml) s napipetovaným množstvím *N*-methylpiperazinu (2,55ml, 0,023 mol) byl přisypán intermediát **Va.** (0,186g, 0,460mmol). Vytvořená suspenze vlivem zvýšení teploty na požadovaných 160°C přešla v roztok. I v případě syntézy koncové MARK III. se jednalo o poměrně efektivní reakci s ohledem na výtěžek a reakční dobu, která činila 4,5 hod. Z ochlazené reakční směsi se ihned po přidavku malého a následně většího množství vody vyloučila bílá krystalická látka. Po zfiltrování a usušení při 50°C jsme obdrželi výtěžek 0,220 g MARK III., což odpovídá výtěžku 84%; t.t.: 189-191°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1,66 – 1,79 (m, 2H), 1,93 – 2,05 (m, 2H), 2,12 – 2,28 (m, 4H),

2,32 (s, 3H), 2,41-2,46 (m, 4H), 3,89 (s, 4H), 4,84 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 5,06 (p, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H), 7,18 – 7,24 (m, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,72 (ddd, *J* = 21,2, 10,9, 4,8 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 8,67 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H),

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 24,68, 24,74, 31,04, 32,32, 44,16, 44,31, 46,27, 46,31, 55,07, 58,08, 58,24, 120,54, 122,13, 122,27, 127,16, 127, 26, 128,19, 128,28, 136,85, 138,58, 139,62, 149,71, 151,06, 154,28, 157,13, 160,62;

HPLC-MS [ESI+] = 426,8

4.3.14 Příprava *N*-(3-Chlorfenyl)-3-cyklopentyl-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5 d]pyrimidin-7-amin (VI. – MARK IV.)

Podmínky derivatizace pro získání MARK IV. byly podobné jako v případě přípravy předchozího derivátu (MARK III.), nicméně rozdílnou výchozí látkou. Meziprodukt **Vb** (0,160g, 0,458 mmol) reagoval s *N*-methylpiperazinem (2,54 ml, 0,0229 mol), po dobu 4,5hod. při teplotě 160°C. Surový produkt se nejdříve vysrážel pomocí malého přídavku vody a takto vytvořená suspenze mohla být snadno filtrovatelná. Bohužel se vyloučení produktu vodou neukázalo z hlediska požadované HPLC čistoty efektivní. Proto bylo nutné surový produkt přečistit pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: CHCl₃ : MeOH, 20:1, stacionární fáze: nemodifikovaný silikagel).

Odparek spojených frakcí: 0,163 g, 86%; t.t.: 159-160°C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.66 – 1.86 (m, 2H), 1.93 - 2.11 (m, 2H), 2.15- 2,33 (m, 4H), 2.40 (s, 3H), 2,47-2,64 (m, 4H), 3,92 – 4,03 (m, 4H), 5,05 – 5,18 (m, 1H), 7,10 (dd, J = 8,0, 0,9 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8,08 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 8,16 (s, 1H);

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ ppm: 24,75, 32,39, 44,42, 46,10, 46,16, 58,28, 58,45, 118,46, 118,56, 120,95, 121,01, 121,23, 123,57, 123,72, 129,80, 129,94, 134,49, 139,61, 151,31, 151,74, 160,35;

HPLC-MS [ESI+] = 412,8

5 Závěr

V rámci bakalářské práce byly nasyntetizovány čtyři deriváty 2,6,9-trisubstituovaných 8-azapurinů metodou výstavby 1,2,3-3*H*-triazolového cyklu, s důrazem na optimalizaci celé syntézy. V průběhu celé syntézy byla vypracována nová metodika přípravy několika klíčových intermediátů. Některé optimalizace využívající báze *t*-BuOK jako například v případě cyklizace I., napomohly k výraznému zvýšení výtěžku až na 55%, dále efektivnějšímu způsobu izolace, neboť celá reakce probíhala v heterogenní fázi a produkt mohl být jednoduše zfiltrován. S těmito fakty souvisí i možnost aplikace daného reakčního kroku ve větším množství.

Mezi další příklady patří cyklizace II, v rámci které výše zmíněná metodika sehrála podstatnou roli, a to hlediska zvýšení výtěžku téměř na dvojnásobek oproti původní proceduře^[27]. Podstatným faktem pro tuto metodu se stala jednoduchost izolačních operací a především vysoká čistota produktu.

V průběhu optimalizace syntetického kroku – chlorace, došlo výraznému zvýšení výtěžku, díky metodě využívající PhPOCl₂ (78%) a POCl₃/Et₃N (43-78%) v porovnání s původní procedurou.^[27]

V neposlední řadě se práce zabývala i rozdílem reaktivity cyklopentylové a benzylové řady intermediátů.

U otestovaných derivátů MARK I.-IV. byla věnována pozornost studiu biologické aktivity, neboť ze znalostí molekulárního cíle mohly být navrženy poměrně efektivní modifikace 8-azapurinového skeletu v polohách C2, C6 a N9. Nejúčinnějšími deriváty se ukázaly být MARK I. a MARK II s CDK2 inhibiční aktivitou (IC₅₀: 1,089 μM a 1,520 μM). Z hlediska selektivity prokázal MARK II pozoruhodnou cytotoxickou aktivitu, kdy na linii K-562 došlo téměř k dvojnásobnému snížení cytotoxické koncentrace (IC₅₀ = 2,49/ 2,64 μM) oproti látce C připravenou doc. Havlíčkem a kol. (IC₅₀ = 5,7 μM). Nicméně z odlišných hodnot IC₅₀ na CDK2/cyklinu E a buněčných liniích je patrný rozdíl v mechanismu účinků, což nabízí široké pole pro biologické screeniny s cílem nalézt vhodné molekulární cíle a následné navržení účinnějších látek.

Seznam použité literatury

- [1] Vývoj nového léku: roscovitin ve II. fázi klinického zkoušení;
rustreg.upol./olomoucine/
- [2] Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H.; Demange, L.; Oumata, N. inventors; Perharidines as CDK inhibitors, WO 2009/034411. 2009
- [3] Paruch, K.; Dwyer, MP.; Alvarez, C. et al.; Pyrazolo[1,5-a]pyridines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007; 17: 6220-3
- [4] Ali, S.; Heathcote, DA.; Kroll, SH.; et al. The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Res.* 2009; 69; 6208-15
- [5] Jorda, R.; Paruch, K.; Krystof, V.; Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres. *Curr. Pharm.Des.* 2012, 18, 2974–2980
- [6] Popowycz, F.; Fournet, G.; Schneider, C.; et al.; Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *J.Med. Chem* 2009; 52: 655-63
- [7] Bettayeb, K.; Sallam, H.; Ferandin, Y.; et al. N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer Ther.* 2008; 2713-24
- [8] Moravcova, D.; Krystof, V.; Havlicek, L.; Moravec, J.; Lenobel, R.; Strnad, M.; Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13; 2989-92.
- [9] Moravcova, D.; Havlicek L.; Krystof V.; Lenobel R.; Strnad M.; inventors; Novel Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines, processes for their preparation and method for therapy. WO 2003/082872. 2003 Oct 9.

- [10] Sroka IM.; Heiss EH.; Havlicek L.; et al.; A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 2010; 77; 255-61
- [11] Jorda R.; Havlicek L.; McNae IW., et al.; Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J. Med. Chem.* 2011; 54; 2980-93
- [12] Parry D.; Guzi T.; Shanahan F., et al.; Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* 2010;
- [13] Williamson DS.; Parratt MJ.; Bower JF., et al.; Structure-guided design of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15; 863-7
- [14] Dwyer MP.; Paruch K.; Alvarez C., et al.; Versatile templates for the development of novel kinase inhibitors: Discovery of novel CDK inhibitors. *Bioorg. Med. Chem Lett.* 2007; 17: 6216-9
- [15] Heathcote DA.; Patel H.; Kroll SH., et al.; A novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein kinases 1,2 and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration. *J. Med. Chem.* 2010; 53: 8508-22.
- [16] Roblin; Lampen; English; Cole; and Vaughn; *J. Am. Chem. Soc.* 1945, 67, 690
- [17] Benson; Frederic, R.; Hartzel; Lawrence W. Savell; Walter, L.; *J. Am. Chem. Soc.* 1950; 72: 1816-18
- [18] C.C.Cheng, B.S.; M.A. Ph.D.; Some pyrimidines of biological and medicinal interest, *Progress in Medicinal Chemistry*; 6: 113
- [19] Brewster; William, K.; Demeter, David, A.; Erickson, W. R.; Lowe, Christian T.; Klittich, Carla J. R.; Nugent, Jaime S.; Rieder, Brent J.; Siddall, Thomas L.; Yao, Chenglin; Yerkes, Carla N.; Zhu, Yuanming. inventors; US2011/54173. 2011
- [20] Albert, A.; *Adv. Heterocycl. Chem.* 1986, 39, 117.

- [21] Barili, P.L.; Biagi, G.; Livi, O.; Scartoni V.; *J.Heterocyclic Chem.*, 1985, 22, 1607.
- [22] Biagi, G.; Franche, M.; Giorgi, I.; Livi, O.; Scartoni V.; *J.Heterocyclic Chem.*, 1989, 26, 39.
- [23] Barili, P.L.; Biagi, G.; Livi, O.; Mucci, L.; Scartoni V.; *J.Heterocyclic Chem.*, **1987**, 24, 997.
- [24] G.Biagi,; I.Giorgi,; O.Livi,; V.Scartoni,; A.Lucacchini,; C. Martini,; P. Tacchi,; *Farmaco* 1994, 49,183.
- [25] Alvarez, Miho T.; Alvarez, Salvador G.; *Synthesis*, 1997; 4: 413 – 414
- [26] Brederick, H.; Baumann, W.; *Liebigs Ann. Chem.* 1967; 701: 143
- [27] Havlicek, L.; Fuksova, K.; Krystof, V.; Orsag, M.; Vojtesek, B.; Strnad, M.; *Bioorg. Med.Chem.* 2005; 13: 5399
- [28] Tyrogenex, INC; Liang, Congxin; *PI3K (delta) selective inhibitors*. WO2011/41399. 2011
- [29] Gucky,T.; Jorda, R.; Zatloukal, M. ; Bazgier, V. ; Berka, K. ; Reznickova, E. ; Beres, T. ; Strnad, M. ; Krystof, V. *J. Med. Chem.*, 2013, 56 (15), 6234–6247
- [30] Holy, A.; *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 2004
- [31] Garrett et al.; 2001
- [32] Goodsell et al.; 2004
- [33] Meijer et al.; 1999
- [34] Shapiro, GI.; Cyclin-dependent kinase pathways as targets of cancer treatment. *J Clin Oncol.* 2006; 24(11): 1770-83
- [35] Chi, Y; Welcker, M; Hizli, AA; Posakony, JJ; Aebersold, R; Clurman, BE; Identification of CDK2 substrates in human cell lysates. *Genome Biol.*2008; 9(10): 149

- [36] Giacinti, C; Giordano, A; RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006; 25(38): 5220-7
- [37] Wang, S; Fisher, PM.; Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29(6): 302-13
- [38] Wölfel, T.; Hauer, M.; Schneider, J.; Serrano, M.; Wölfel, C; Klehmann-Hieb, E.; De Plaen, E.; Hankeln, T.; Meyer zum Büschenfelde, KH.; Beach, D.; *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. *Science*. 1995; 269(5228): 1281-4
- [39] Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, JJ.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, DS.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem*. 1994; 224(2):771-86
- [40] Havlicek, L.; Hanus, J.; Vesely, J; Leclerc, S.; Meijer, L.; Shaw, G.; Strnad, M.; Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem*. 1991; 40(4): 408-12
- [41] Tannock; Hill et al.; 2005
- [42] LaBaer; Garrett a kol.; 1997
- [43] Cheng; Olivier a kol.; 1999
- [44] M.A. Ali; H. Choy; A.A. Habib; D. Saha; *Neoplasia*. 2007; 9: 370-381
- [45] L.H. Stockwin; S.X. Yu; H. Stotler; M.G. Hollingshead; D.L. Newton; *Cancer* 2009; 9: 63
- [46] Corcoran, MM; Mould, SJ; Orchard, JA; Ibbotson, RE; Chapman, RM; Boright, AP; Platt, C; Tsui, LC; Scherer, SW; Oscier, DG; Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene*. 1999; 18(46): 6271-7

- [47] Wilson, S.C.; Atrash, B.; Barlow, C.; Eccles, S.; Fischer, P.M.; Hayes, A.; Kelland, L.; Jackson, W.; Jarman, M.; Mirza, A.; Moreno, J.; Nutley, B.P.; Raynaud, F.I.; Sheldrake, P.; Walton, M.; Westwood, R.; Whittaker, S.; Workman, P.; McDonald, E.; *Design, synthesis and biological evaluation of 6-pyridylmethylaminopurines as CDK inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19: 6949-6965.
- [48] Zatloukal, M.; Jorda, R.; Gucky, T.; Reznickova, E.; Voller, J.; Pospisil, T.; Malinkova, V.; Adamcova, H.; Krystof, V.; Strnad, M. *Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases*. *Eur. J. Med. Chem.* 2013; 61: 61–72
- [49] Bettayeb, K.; Oumata, N.; Echalié, A.; Ferandin, Y.; Endicott, J.A., Galons, H.; Meijer, L. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases., *Oncogene*. 2008; 27(44):5797-807
- [50] Malínková, Veronika. Příprava a biologická aktivita nových 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potenciální vyšší metabolickou stabilitou. Olomouc, 2013. diplomová práce (Mgr.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fak
- [51] Imbach, P.; Capraro, H.G.; Furet, P.; Mett, H.; Meyer, T.; Zimmermann, J. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*; 2009; 9: 91-96
- [52] Bettyeb, K.; Oumata, N.; Echalié, A.; Ferandin, Y.; Endicott, J.A.; Galons, H.; Meijer, L. *Oncogene*; 27: 5797-5807