

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Vývoj imidazopyrimidinů jako inhibitorů cyklin dependentních kinas

**Tereza Havlíková
Olomoucký kraj**

Olomouc 2021

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Vývoj imidazopyrimidinů jako inhibitorů cyklin dependentních kinas

Development of imidazopyrimidines as inhibitors of cyclin dependent kinases

Autoři: Tereza Havlíková

Škola: Gymnázium Olomouc-Hejčín, Tomkova 45, 779 00
Olomouc

Kraj: Olomoucký

Konzultant: Mgr. Lukáš Jedinák, Ph.D.

Olomouc 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze literaturu uvedenou v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 27.03.2021 Tereza Havlíková

Poděkování

Děkuji vedoucímu své práce, Mgr. Lukášovi Jedinákovi, Ph.D., za jeho vedení, připomínky trpělivost, věnovaný čas a obětavou pomoc, bez kterých by tato práce nevznikla. Mé poděkování patří i Mgr. et Mgr. Monice Tomanové za její odbornou pomoc.

ANOTACE

Tato práce si klade za cíl objasnit základní poznatky o cyklin dependentních kinasach, zejména se orientuje na skupinu cyklin dependentních kinas 4, jejich funkci v buněčném cyklu a jejich inhibici. V části praktické je zaznamenána příprava 3 potenciálních imidazopyrimidinových inhibitorů prostřednictvím Chan-Evans-Lam reakce a Buchwald-Hartwig aminace.

Klíčová slova: Cyklin dependentní kinasy, cyklin dependentní kinasy 4, inhibitory cyklin dependentních kinas, imidazopyrimidiny, Chan-Evans-Lam reakce, Buchwald-Hartwig aminace

ANOTATION

The goal of this work is to clarify basic knowledge about cyclin dependent kinases, mainly cyclin dependent kinases 4, their function in the cell cycle and their inhibition. The practical part describes preparation of 3 potential imidazopyrimidine inhibitors by the means of Chan-Evans-Lam reaction and Buchwald-Hartwig amination.

Key words: Cyclin dependent kinases, cyclin dependent kinases 4, inhibitors of cyclin dependent kinases, imidazopyrimidines, Chan-Evans-Lam reaction, Buchwald-Hartwig amination

Obsah

1	Úvod	6
2	Cyklin dependentní kinasy	7
2.1	CDK 4	8
2.2	Inhibitory cyklin dependentních kinas	8
2.2.1	Inhibitory CDK4	10
3	Chan–Evans–Lam coupling	11
3.1	Mechanismus	11
3.2	Využití	12
4	Buchwald–Hartwig reakce	14
4.1	Mechanismus	14
4.2	Využití	15
5	Experimentální část	16
5.1	Obecné informace	16
5.2	Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu	16
5.2.1	Příprava 2-chlor-N4-(2,4-dimethoxybenzyl)-N5-methylpyrimidin-4,5-diaminu (3)	16
5.2.2	Příprava 2-chlor-9-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (4)	17
5.2.3	Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (5)	17
5.3	Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(o-tolyl)-7H-purin-8(9H)-onu (C)	18
5.3.1	Příprava 2-chlor-7-methyl-9-(o-tolyl)-7H-purin-8(9H)-onu (A)	18
5.3.2	Příprava terc-butyl 4-(4-((7-methyl-8-oxo-9-(o-tolyl)-8,9-dihydro-7H-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (B)	18
5.3.3	Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(o-tolyl)-7H-purin-8(9H)-onu (C)	19
5.4	Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (F)	20
5.4.1	Příprava 2-chlor-7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-7H-purin-8(9H)-onu (D)	20
5.4.2	Příprava terc-butyl 4-(4-((7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-8-oxo-8,9-dihydro-7H-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (E)	20
5.4.3	Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (F)	21

5.5	Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (I)	22
5.5.1	Příprava 2-chlor-9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (G)	22
5.5.2	Příprava terc-butyl 4-(4-((9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-8-oxo-8,9-dihydro-7H-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (H)	22
5.5.3	Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (I)	23
6	Diskuze a výsledky	24
6.1	Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (5)	24
6.2	Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(o-tolyl)-7H-purin-8(9H)-onu (C)	24
6.3	Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (F)	25
6.4	Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (I)	25
7	Inhibice CDK a cytotoxicita	26
8	Závěr	27
9	Citovaná literatura	28
10	Seznam zkratk	31
11	Seznam obrázků	33
12	Seznam schémat	34
13	Seznam tabulek	35
14	Příloha 1: NMR spektra	36

1 Úvod

Cyklin dependentní kinasy (dále CDK) jsou skupinou proteinů, které jsou aktivovány navázáním cyklinu na svou strukturu. Tato skupina enzymů je v dnešní době předmětem mnoha biologických studií, poněvadž jejich schopnosti ovlivňovat buněčný cyklus mohou být využity při výzkumu nových léků např. proti rakovinnému bujení. Zastavením buněčného cyklu napadených buněk se zabraňuje dalšímu rychlému šíření zhoubných nádorů, čehož se může dosáhnout mimo jiné inhibicí CDK.

Část výzkumu inhibitorů CDK se orientuje na deriváty imidazopyrimidinů, které by mohly mít dostatečnou biologickou aktivitu a mohly by být potenciálními inhibitory CDK4 a CDK6. Možné inhibitory CDK4 byly připraveny prostřednictvím šestikrokové syntézy navržené na Univerzitě Palackého v Olomouci (schéma č. 1). Struktura látek byla inspirována již schváleným léčivem palbociclibem. Klíčovými kroky syntézy byly Chan-Evans-Lam coupling a Buchwald-Hartwigova aminace. Tyto reakce jsou blíže popsány v části teoretické.

Tato práce si dává za cíl seznámit čtenáře se základními poznatky o CDK, přiblížit mu problematiku biologických inhibitorů CDK, výzkum syntetických inhibitorů a obeznámit ho blíže se skupinou CDK4 a jejich inhibitory, kterými se tato práce primárně zabývá. Praktická část práce, která byla provedena na přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, pak popisuje provedenou syntézu imidazopyrimidinů prostřednictvím šestikrokové syntézy. Připravené látky již byly testovány na externím pracovišti za účelem určení jejich biologické aktivity.

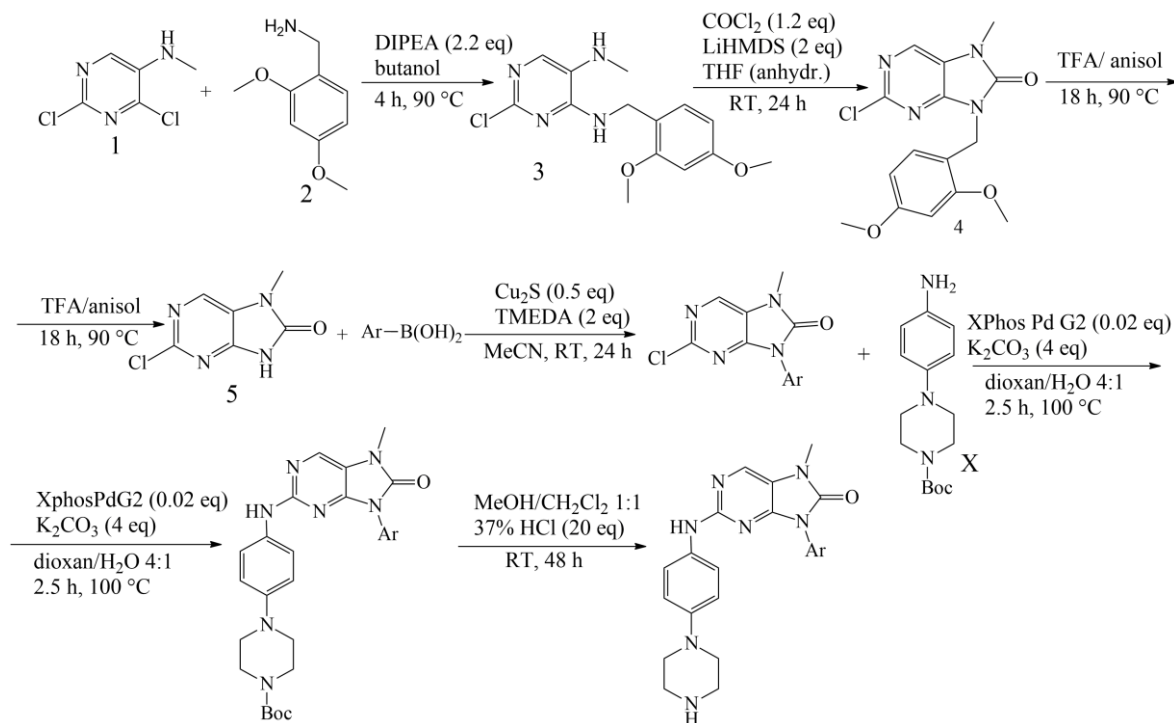


Schéma č. 1 6kroková syntéza přípravy potenciálních CDK inhibitorů

2 Cyklin dependentní kinasy

Fosforylace proteinů (např. enzymů) je jednou z hlavních post-translačních modifikací a jejím hlavním úkolem je kontrola a řízení buněčných procesů. Zavedení fosfátového zbytku, nejčastěji na volnou OH skupinu serinu, threoninu nebo tyrosinu, dokáže vyvolat výrazné změny v prostorové struktuře proteinu a tím ovlivnit jeho funkci a aktivitu (schéma č. 2). V lidském genomu je kódováno více než 500 protein-kinas, z nichž farmakologicky významné jsou ty, jejichž aktivita je spjata s vážnými onemocněními (1). Mezi nejvýznamnější a nejvíce studované kinasy patří cyklin dependentní kinasy, jejichž deregulace je spojena s řadou nádorových onemocnění (2).

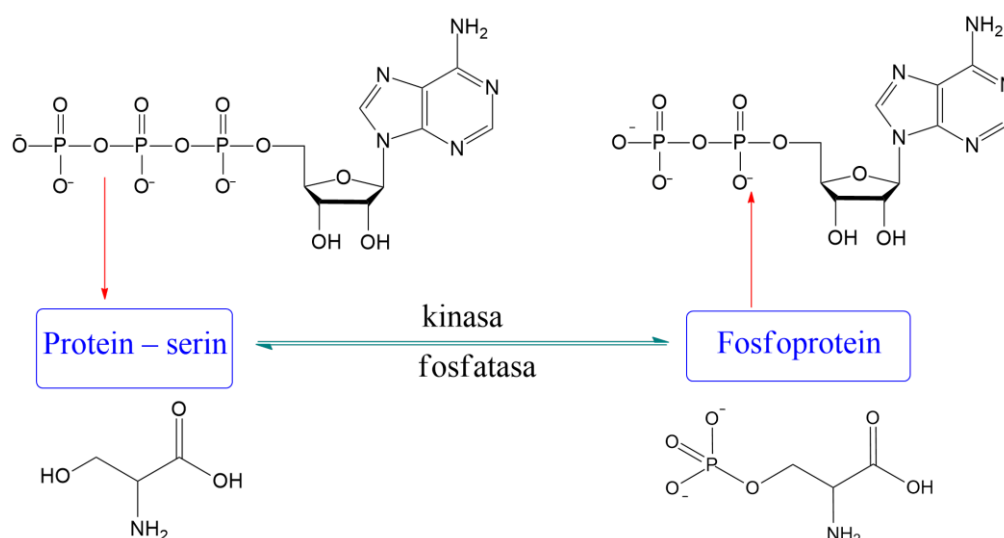
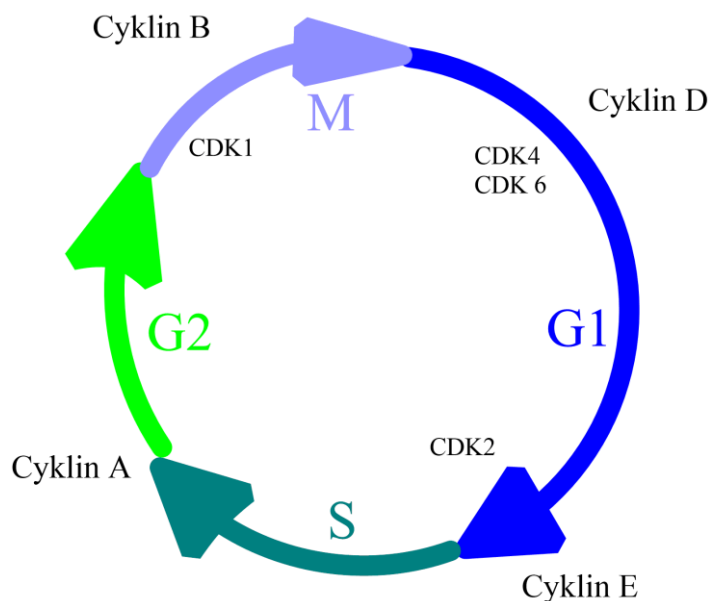


Schéma č. 2 Fosforylace serinu fosfátem z ATP

Cyklín dependentní kinasy, dále pouze CDK, jsou skupinou enzymů z řady serin-threoninových kinas, které hrají důležitou roli při regulaci buněčného dělení (3). CDK jsou tvořeny zhruba 300 jednotkami aminokyselin a pro svou funkci vyžadují vazbu s cyklinem, což je rovněž protein (4). Terciální strukturu CDK v neaktivované formě tvoří α -helixy, které jsou součástí C-terminální domény, a β -list a PSTAIRE helix, které jsou součástí N-terminální domény. (4; 5) Po vytvoření nekovalentních interakcí s cyklinem a nutné fosforylaci OH skupiny threoninu prostřednictvím cyklin aktivačních kinas v T smyčce, která by jinak blokovala aktivní místo pro přístup substrátu, se mění trojrozměrná struktura a vzniká aktivní komplex CDK. Ten je schopen fosforylaci OH skupiny serinových nebo threoninových zbytků proteinů regulovat aktivitu buněčných proteinů. Zdrojem fosfátu pro fosforylaci je molekula ATP, která se váže do aktivního místa CDK, jenž se nachází v záhybu mezi N-terminální doménou a C-terminální doménou (4).

CDK byly objeveny díky své roli v buněčném dělení. V roce 2001 získali Nobelovu cenu za medicínu Leland Hartwell, Tim Hunt a Paul Nurse za popis regulace buněčného cyklu prostřednictvím CDK (6). Tyto enzymy aktivují prostřednictvím fosforylace proteiny, které kontrolují buněčný cyklus, to znamená, že např. zajišťují vstup do další fáze, nebo zastavení cyklu při detekci chyb. Jednotlivé CDK se liší druhem cyklinu, který je aktivuje a fází buněčného cyklu, jež ovlivňují (obrázek č. 1). Některé CDK se nepodílí na regulaci buněčného cyklu ale např. CDK7, CDK8, CDK9 na transkripci DNA, nebo CDK5 na nervové diferenciaci a na dalších procesech ovlivňujících neurony (4; 6).



Obrázek č. 1 CDK, cykliny, které je aktivují, a fáze buněčného cyklu, jež ovlivňují

2.1 CDK 4

Cyklin dependentní kiny 4 jsou skupinou CDK, jejíž hlavní rolí je regulace G1 fáze buněčného cyklu. Tyto kiny jsou aktivovány D-typem cyklinu a regulovány skupinou proteinů INK4 a CIP/KIP. Jejich primární rolí je fosforylace retinoblastomového proteinu (pRb), jenž se touto modifikací inhibuje, a je tak umožněno proběhnutí G1/S přechodu. Retinoblastomový protein totiž ve své aktivované formě zabraňuje buňce přechod do další buněčné fáze tím, že způsobuje represi E2F-DP komplexů, které za aktivního stavu umožňují genovou expresi G1/S přechodu. Díky inhibici retinoblastomového proteinu se začnou produkovat proteiny, potřebné k přechodu buňky do S fáze. Mimo jiné se také začne produkovat cyklin E a dochází k aktivaci CDK2, který začne provádět dodatečnou fosforylaci retinoblastomového proteinu a posilovat tak účinek jeho předchozí inhibice (7).

2.2 Inhibitory cyklin dependentních kinas

Inhibitory CDK jsou látky deaktivující tyto kiny. V organismech se jedná o tzv. CKI proteiny, které lze rozdělit do dvou základních skupin, a to do INK4 a CIP/KIP skupiny (7).

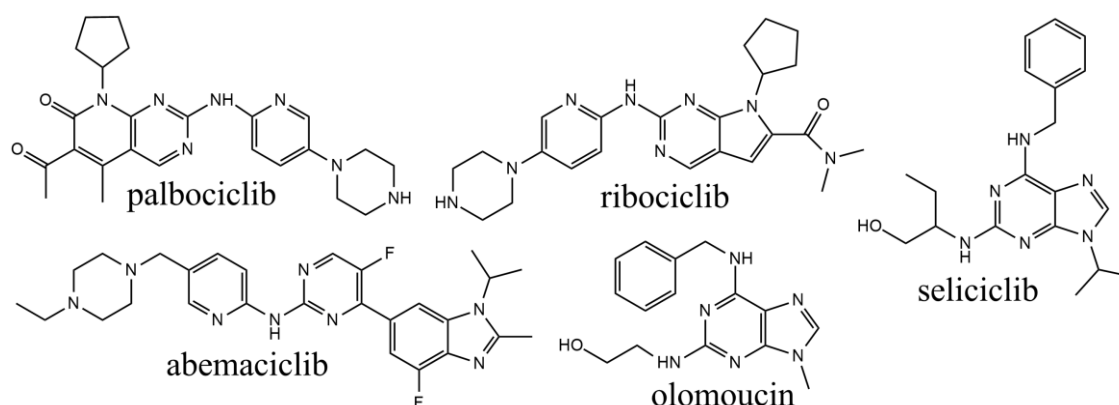
Tyto látky nejenom ovlivňují buněčný cyklus, ale také transkripci DNA a apoptózu buňky (8).

INK4 jsou látky zamezující navázání cyklinu D na CDK4 a CDK6 za účelem inhibice aktivního komplexu, nebo se samy na CDK4 a CDK6 váží, a tak tyto enzymy inhibují. Prostřednictvím inhibice zabraňují buňce dokončit G1 fázi a cyklus tak zastaví na kontrolním bodu. Mezi tuto skupinu inhibitorů patří např. proteiny p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} and p19^{INK4D} (9).

CIP/KIP skupina proteinů je schopna inhibice CDK aktivovaných cyklinem A, E. Do této skupiny inhibitorů patří proteiny p21^{cip1}, p27^{kip1} a p57^{kip2}. Jsou schopny jak interakce s příslušným cyklinem, tak i s danou CDK. Mimo to se ukázalo, že se jedná o pozitivní regulátory CDK4/6, které jsou aktivovány cyklinem D (7).

Látky inhibující cyklin dependentní kiny jsou zkoumány kvůli svému potenciálnímu využití jako léků proti rakovině, neurodegenerativním onemocněním a infekcím (6). Zhoubné bujení může způsobovat deaktivaci biologických inhibitorů CDK nebo nadměrnou aktivitu samotných CDK, což vede k nekontrolovanému buněčnému dělení. Látky, které inhibují CDK, způsobí narušení průběhu buněčného cyklu, a tudíž je rakovinné bujení zabráněno v dalším dělení a dochází k jejímu zániku (9). Problémem vývoje těchto léků je jejich schopnost zaměřit se i na buňky nenapadené rakovinným bujením, jejich nepoužitelnost na některé druhy rakovin a dále vedlejší efekty po podání (9; 6). Jako příklad vedlejších účinků lze uvést hypokalémii a nevolnost způsobené seliciclibem, který nebyl prozatím schválen jako léčivo (10).

Mezi již schválené léky, které působí protinádorově díky inhibici CDK, patří např. palbociclib, ribociclib a abemaciclib. Tato léčiva patří do tzv. třetí generace, která je na rozdíl od první a druhé generace CDK inhibitorů více potentní a selektivní, tudíž způsobuje méně vedlejších účinků. Jako příklad CDK inhibitorů první generace lze uvést již zmíněný seliciclib (9). Jedním z prvních selektivních inhibitorů CDK, který byl testován pro léčbu nádorových onemocnění, byl v Olomouci objevený purinový derivát olomoucín (obrázek č. 2) (11).



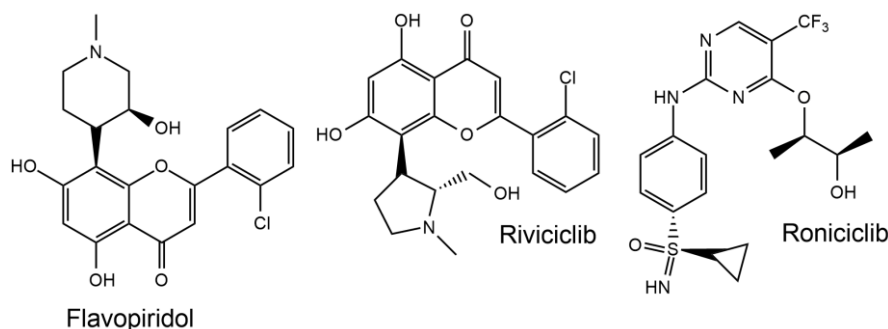
Obrázek č. 2 Struktury léčiv inhibujících cyklin dependentní kiny: palbociclib, ribociclib, abemaciclib, olomoucín, seliciclib

2.2.1 Inhibitory CDK4

Prostřednictvím inhibice CDK4 může buňka projít apoptózou. Buňce je zabráněno pokračovat v buněčném cyklu, poněvadž nedochází k fosforylaci pRb, a tudíž nedochází k jeho inhibici, která by umožnila G1/S přechod (6). CDK4 jsou inhibovány skupinou proteinů INK4, mezi které patří proteiny p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}. Tato třída inhibuje CDK4 buďto znemožněním navázání cyklinu D potřebného k aktivaci, anebo navázáním na CDK4, kdy dojde k jeho prostorovému přeskupení, a tudíž i k deaktivaci (9). Pokud dochází k nedostatečné produkci INK4 inhibitorů nebo k jejich deaktivaci, může nastat zhoubné bujení. Např. u glioblastomu nebo rakoviny slinivky břišní se prokázala ztráta účinných p16^{INK4A} (8; 12).

Dalším mechanismem inhibice může být i transkripční faktor p53, který způsobuje při chybně provedené retinoblastomové dráze nebo poškození DNA zastavení buněčného cyklu a opravu chyb, nebo až apoptózu buňky. Transkripční faktor mimo jiné způsobuje genovou expresi p21^{cip1}, jenž je schopen inhibovat aktivované proteiny CDK4 (8). P21^{cip1} patří do skupiny CIP/KIP proteinů, která je schopna ale v určitých případech CDK4 i aktivovat. Schopnost proteinu p21^{cip1} měnit aktivitu CDK4 není stále plně objasněna (13). Pokud nastane mutace genů, které kódují p53, dochází i k nekontrolovatelnému buněčnému dělení, což může být příčinou některých pokročilých stádií rakovin vaječníků (9).

Mezi inhibitory první generace, které inhibují CDK4, patří např. flavopiridol, který ale neprokázal dostatečnou aktivitu in vivo. Inhibitory druhé generace, roniciclib, riviciclib (obrázek č. 3), nejsou stejně jako inhibitory první generace selektivní. Třetí generace inhibitorů se začala orientovat hlavně na selektivní inhibici CDK4/6. Tyto látky jsou schopné se zaměřovat na rakovinné buňky, které jsou více citlivé na inhibitory díky hyperaktivitě CDK4-cyklin D komplexu, jež je často provázena ztrátou p16^{INK4A} inhibitorů, nebo jsou citlivější kvůli nadprodukcí cyklinu D. V normálních buňkách tyto inhibitory nezpůsobují inhibici CDK4/CDK6. Navíc může být role těchto CDK ve zdravých buňkách částečně vykompenzována prostřednictvím CDK1. Díky tomuto efektu nedochází k některým nežádoucím vedlejším účinkům typickým pro starší generace (9). Ribociclib, palbociclib a abemaciclib (obrázek č. 1), patří do třetí generace inhibitorů, byly již povoleny FDA pro použití. Všechny se využívají k léčbě rakoviny prsu (14).



Obrázek č. 3 Struktury uvedených inhibitorů první a druhé generace: flavopiridol, riviciclib, roniciclib

3 Chan–Evans–Lam coupling

Chan-Evans-Lamova (CEL) reakce, pojmenovaná po svých nezávislých objevitelích (15; 16; 17), je oxidativní C-X coupling, kdy dochází ke vzniku vazby mezi dvěma nukleofily, jedním uhlíkatým (C) a druhým obsahujícím heteroatom (X) (schéma č. 3) (18). Uhlíkatý nukleofil má reaktivní atom C nejčastěji v sp^2 hybridizaci, méně časté jsou případy CEL s sp^3 nebo sp hybridizovanými C-nukleofily (19). Typickými C-nukleofily jsou arylboronové kyseliny nebo jejich estery. X-nukleofil obvykle obsahuje jako heteroatom dusík, kyslík, méně často selen, síru nebo halogeny. Typickými zástupci X-nukleofilů jsou aminy, alkoholy a pětičlenné N-heterocyklické sloučeniny. CEL coupling vyžaduje katalýzu přechodnými kovy nebo jejich komplexy, ve většině případů se využívá měď, méně často nikl, železo nebo jiné kovy (20). Katalytická aktivita mědi je do značné míry ovlivněna přítomností ligandů, které se k ní koordinují (18; 20).

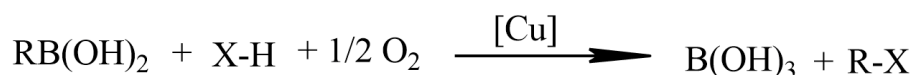


Schéma č. 3 Všeobecné reakční schéma Chan-Evans-Lam couplingu

3.1 Mechanismus

Katalyzátorem CEL reakce jsou koordinační sloučeniny mědi v oxidačním stavu 1 nebo 2, které reagují s boronovou kyselinou $RB(OH)_2$ (transmetalace) a X-H nukleofilem (koordinace) za vzniku nového komplexu. Tento komplex je následně oxidován za vzniku $[Cu]$ v oxidačním stavu 3, který podléhá reduktivní eliminaci za vzniku produktu a současné regenerace katalyzátoru (schéma č. 4) (18).

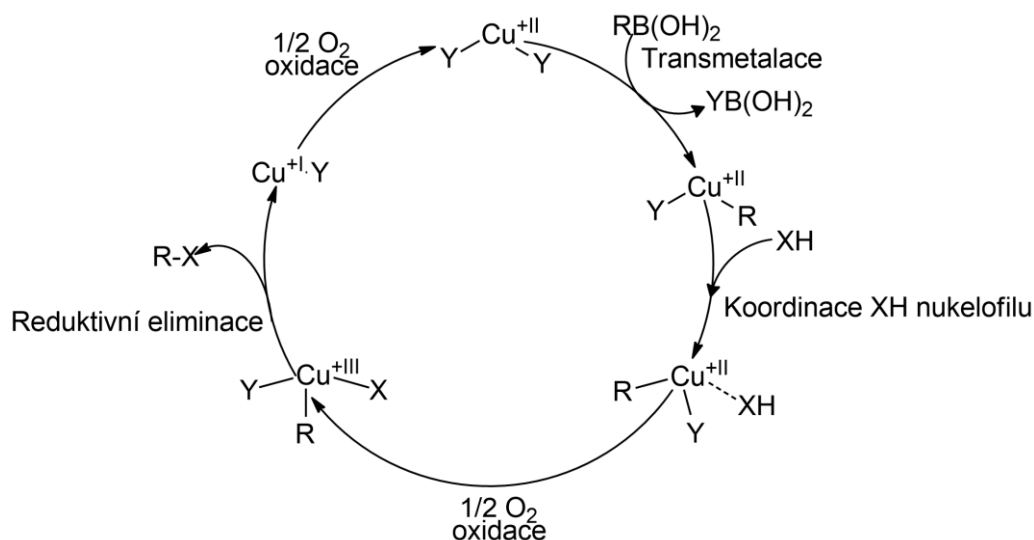


Schéma č. 4 Mechanismus CEL reakce

3.2 Využití

CEL reakce je využívána pro syntézu biologicky aktivních látek díky své schopnosti vytvořit vazbu uhlík-heteroatom, hlavně pak vazbu uhlík-dusík (21). Jedinečné postavení zaujímá v oblasti N-arylace heterocyklických sloučenin, kde není k dispozici žádná jiná podobně efektivní reakce (18).

Hlavní význam má arylace pyrimidinů a purinů, kteří jsou důležitou součástí biologicky aktivních látek, a tudíž získání N¹-arylpurimidinů a N⁹-arylpurinů. Jednou z prvních provedených reakcí tohoto druhů je arylace 2,6-dichlorpurinu pomocí boronové kyseliny, obsahující příslušné arily, a acetátu měďnatého, který má úlohu katalyzátoru (schéma č. 5) (21).

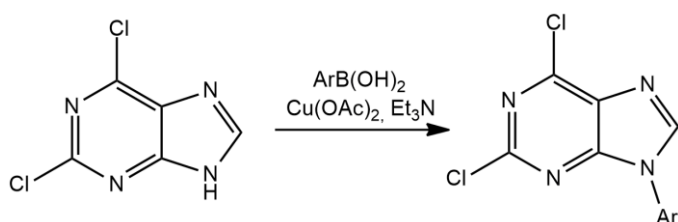


Schéma č. 5 N⁹-arylace 2,6-dichlorpurinu CEL reakcí

Arylace dusíkatých bází by šlo využít k přípravě léčiv na bázi oligonukleotidů (21), které se používají např. jako tzv. antisense oligonukleotidy, které se komplementárně navazují na daná místa v mRNA, a zabraňují tak translaci proteinů, nebo jako siRNA, které způsobují RNA interferenci (22). Jako příklad lze uvést arylaci adeninu a cytosinu katalyzovanou acetátem měďnatým (schéma č. 6) (21).

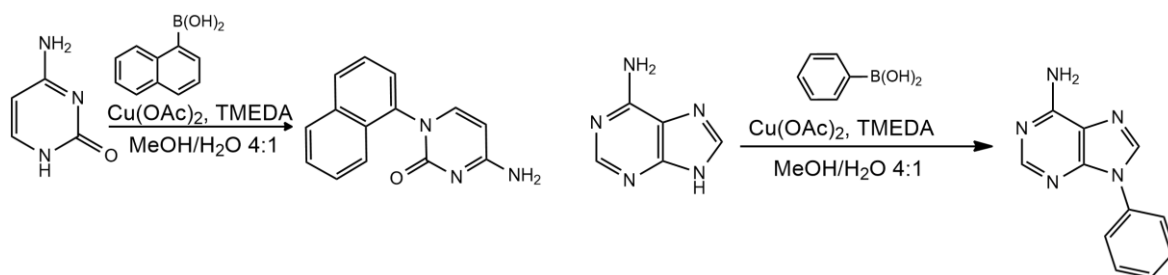


Schéma č. 6 Arylace adeninu a cytosinu prostřednictvím CEL couplingu

Medikamenty působící jako inhibitory faktoru Xa, který se podílí na srážení krve, lze mimo jiné připravit N-arylací pyrazolů (23; 21). Inhibitor FXa lze připravit prostřednictvím několika na sebe navazujících couplingových reakcí (schéma č. 7) (21).

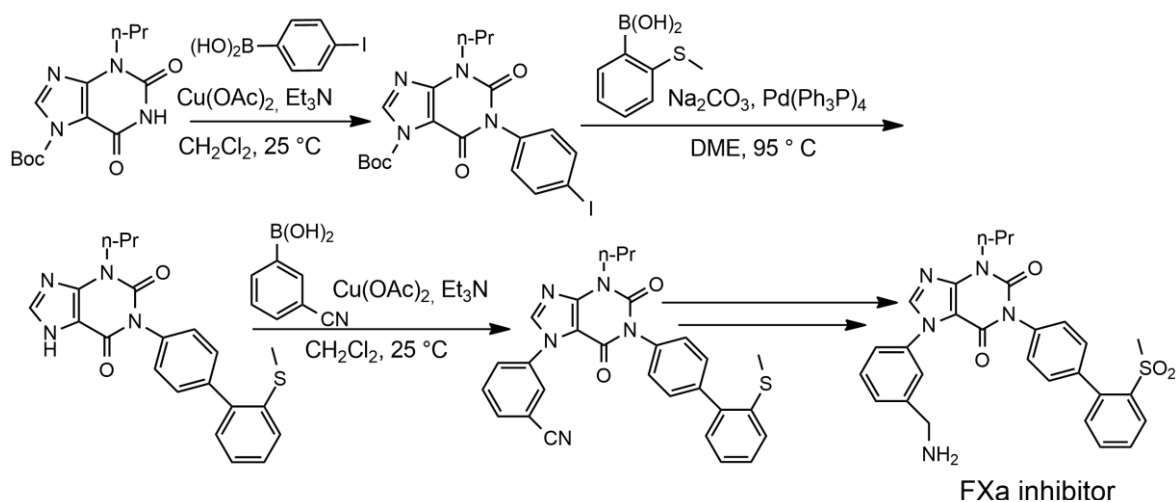


Schéma č. 7 Příprava FXa inhibitoru

Navržená syntéza C-N biarylových atropisomerů, jejichž chiralita je způsobena nemožností rotace substituentu kolem vazby, využívá CEL couplingu arylboronových kyselin a imidazolů, který je katalyzován $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ v prostředí TMEDA (schéma č. 8) (21).

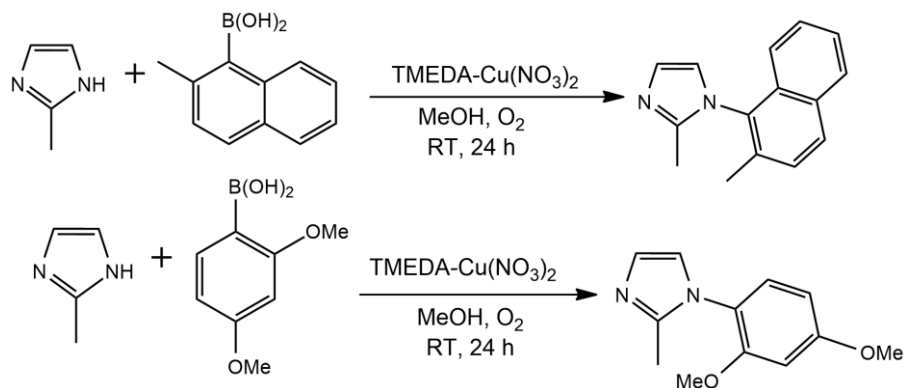


Schéma č. 8 CEL reakce využitá při přípravě atropisomerů

4 Buchwald–Hartwig reakce

Buchwald-Hartwig coupling, pojmenovaný po svých nezávislých průkopnících (24; 25), je palladiem katalyzovaná reakce mezi elektrofilními halogenidy a X-nukleofily, kde X je nejčastěji dusík nebo kyslík (26; 27). Při reakci dochází k vytvoření vazby mezi uhlíkem, který je nejčastěji v sp² hybridizaci, a heteroatomem (schéma č. 9) (26).

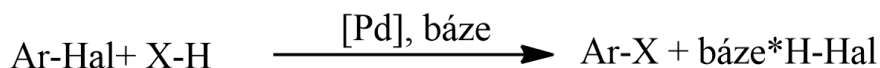


Schéma č. 9 Obecné schéma Buchwald-Hartwig aminace

4.1 Mechanismus

Jak již bylo řečeno, reakce využívá jako katalyzátorů komplexů palladia. Během let bylo objeveno mnoho druhů použitelných katalyzátorů, které se lišily svou citlivostí na reakční podmínky a počtem sloučenin, jež jsou schopny katalyzovat na základě svých sterických a elektronových možností (26).

Katalyzátor prvně podléhá oxidativní adici navázáním arylhalogenidu. Následně se v druhém kroku na oxidovaný komplex koordinuje X-H nukleofil. Po odštěpení halogenovodíkové kyseliny, která je ihned neutralizována přítomnou bází, dochází k reaktivní eliminaci. Při reaktivní eliminaci vzniká produkt a regeneruje se původní katalyzátor (schéma č. 10) (28).

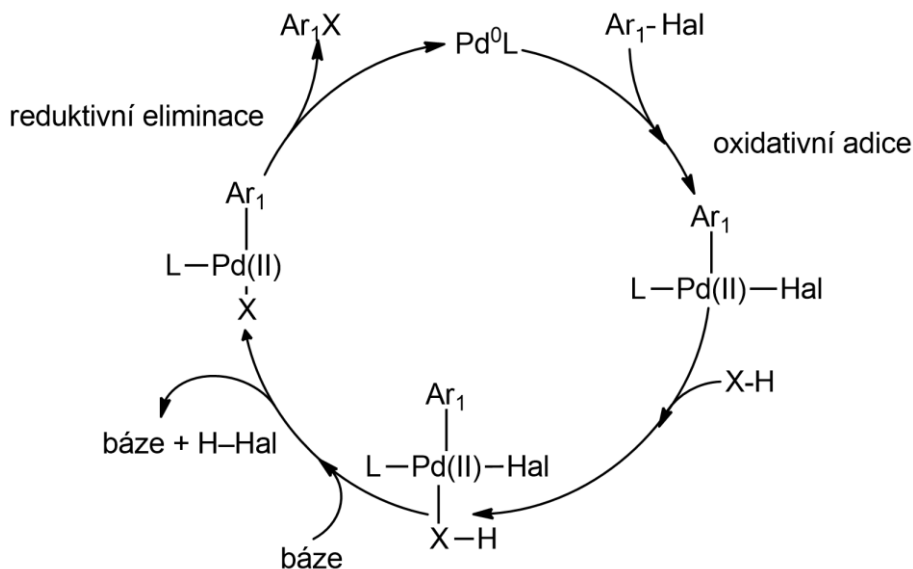


Schéma č. 10 Mechanismus Buchwald-Hartwig aminace

4.2 Využití

Stejně jako u Chan-Evans-Lamovy reakce dochází ke vzniku vazby dusík-uhlík. Zatímco CEL má dominantní postavení při N-arylace heterocyklů, Buchwald-Hartwigova reakce je vhodnější pro N-arylace aminů (21; 26).

Buchwald-Hartwigovy reakce lze používat v průmyslovém měřítku k výrobě léčiv a agrochemikálií (26). Jako příklad lze uvést fungicid sedaxan, jehož intermediát je získán couplingem chlorarenu a benzylaminu. Produkt tohoto couplingu je následně štěpen, za účelem získání nutného anilinu, který je dále zpracován. (schéma č. 11) (29; 26).

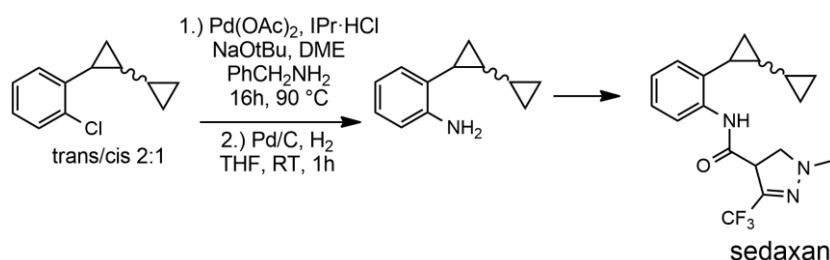


Schéma č. 11 Buchwald-Hartwigova aminace využítá při výrobě sedaxanu

Jako další příklad lze uvést venetoclax, také prodáván pod jménem venclexta, jenž se využívá k léčbě chronické lymfatické leukémie (schéma č. 12) (30; 26).

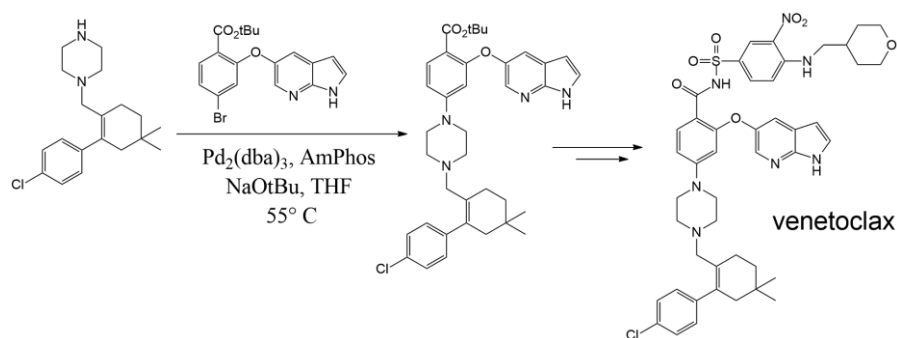


Schéma č. 12 Buchwald-Hartwigova aminace využítá při výrobě venetoclaxu

Jedním z experimentálních léků syntetizovaných mimo jiné touto reakcí je i AMG925, který je potenciálním inhibítorem jak CDK4, tak i FLT3 (schéma č. 13) (31; 26).

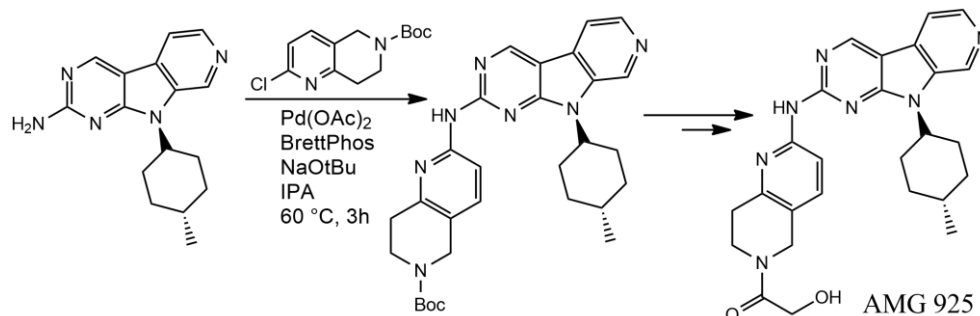


Schéma č. 13 Buchwald-Hartwigova aminace využítá při přípravě AMG 925

5 Experimentální část

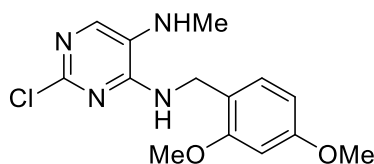
5.1 Obecné informace

Chemikálie a rozpouštědla pro syntézu byly získány z běžných komerčních zdrojů a byly použity bez dalšího čištění. Všechny reakce byly provedeny ve vyžíhaném laboratorním skle v inertní atmosféře dusíku nebo argonu, s výjimkou Chan-Evans-Lam reakce, která byla provedena za přístupu vzdušného kyslíku. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (hliníkové destičky se silikagelem 60 F₂₅₄) nebo prostřednictvím HPLC/MS (kolona: C-18, mobilní fáze: gradient MeCN-octanový pufr, průtok: 1 mL/min).

Čistota izolovaných sloučenin a jejich identita se ověřovala pomocí HPLC/MS a NMR (JEOL 400 MHz pro ¹H a 100 MHz pro ¹³C).

5.2 Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu

5.2.1 Příprava 2-chlor-*N*⁴-(2,4-dimethoxybenzyl)-*N*⁵-methylpyrimidin-4,5-diaminu (**3**)

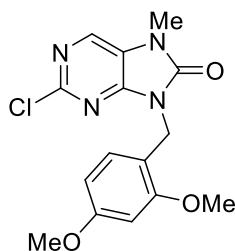


Obrázek č. 4 Struktura látky **3**

Pyrimidin **1** (4.11 g, 23.1 mmol) byl rozpuštěn v butanolu (50 mL). Do roztoku byl přidán amin **2** (3.47 mL, 23.1 mmol) a DIPEA (8.84 mL, 50.8 mmol). Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Poté byla do reakční směsi přidána H₂O (10 mL) a po ochlazení reakční směsi došlo k vykrytalizování produktu **3**. Bílá sraženina byla odfiltrována a vysušena za vysokého vakua (<0.01 Torr) do konstantní hmotnosti (5.41 g, 76 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.41 (s, 1H), 7.28 – 7.25 (m, 1H), 6.47 – 6.42 (m, 2H), 5.41 (s, 1H), 4.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.78 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 160.9, 158.9, 156.0, 150.8, 135.1, 131.2, 128.2, 118.5, 104.1, 98.8, 55.5, 40.8, 30.9 ppm.

5.2.2 Příprava 2-chlor-9-(2,4-dimethoxybenzyl)-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (4)

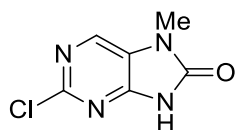


Obrázek č. 5 Struktura látky 4

Sloučenina **3** (5.41 g, 17.5 mmol) byla rozpuštěna v suchém THF (80 mL). Do roztoku byl pomalu přikapán fosgen (15% v toluenu, 15 mL, 21 mmol) při teplotě -10 °C. Poté byl pomalu přikapán roztok LiHMDS (1M v THF, 35 mL, 35 mmol), konečná teplota po přikapávání byla -1 °C. Směs byla promíchávána 24 hodin. Reakce byla ukončena přidáním H₂O (20 mL) a vykrystalizovaná bílá látka **4** byla odfiltrována a vysušena do konstantní hmotnosti (3.23 g, 55 %) prostřednictvím IR lampy.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.97 (s, 1H), 7.22 – 7.20 (m, 1H), 6.43 – 6.40 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.42 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 161.1, 158.6, 153.1, 152.7, 151.4, 132.4, 130.8, 122.5, 115.6, 104.2, 98.7, 55.6, 55.5, 39.5, 27.6 ppm.

5.2.3 Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (5)



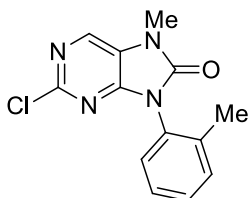
Obrázek č. 6 Struktura látky 5

Sloučenina **4** (0.50 g, 1.49 mmol) byla suspendována v anisolu (8 mL) a k reakční směsi byla přikapána TFA (6 mL). Reakční směs byla míchána za teploty 90 °C po dobu 18 hodin. Po odpaření rozpouštědel byla reakční směs neutralizována pomocí NaHCO₃ (2 g). Po přidání silikagelu (2 g) byla směs zkoncentrována na rotační vakuové odparce. Surový odparek byl nanesen na kolonu silikagelu a čištěn chromatograficky s mobilní fází hex/EtOAc 2:1 až 1:2. Spojené frakce obsahující produkt **5** byly zahuštěny na rotační vakuové odparce. Odparek byl vymíchán v Et₂O a přefiltrován, čímž se získala sloučenina **5** jako bílá amorfnní látka (0.14 g, 51 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.35 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 3.30 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 153.1, 151.5, 150.4, 133.3, 123.7, 26.9 ppm.

5.3 Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(*o*-tolyl)-7*H*-purin-8(9*H*)-onu (C)

5.3.1 Příprava 2-chlor-7-methyl-9-(*o*-tolyl)-7*H*-purin-8(9*H*)-onu (A)

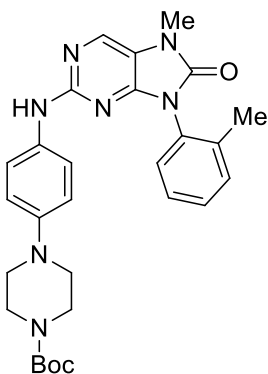


Obrázek č. 7 Struktura látky A

Do 10 mL lahvičky byl přidán Cu₂S (40 mg, 0.25 mmol), MeCN (3 mL) a TMEDA (0.15 mL, 1.0 mmol). Výsledná směs byla míchána za laboratorní teploty 1 hodinu. Následně byla přidána sloučenina **5** (92 mg, 0.50 mmol) a *o*-tolylboronová kyselina **T** (136 mg, 1.0 mmol). Reakční směs byla promíchána za přítupu vzduchu za laboratorní teploty 24 hodin. Poté byla reakce ukončena přidavkem nasyceného roztoku NH₄Cl a extrahována do EtOAc (3 x 10 mL). Po vysušení extraktu pomocí MgSO₄ a odpaření rozpouštědel byl produkt čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze: hex/EtOAc 2:1 až 1:2). Po odpaření rozpouštědel se získala bílá amorfnní látka **A** (121 mg, 88 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.48 – 7.45 (m, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 3.46 (s, 3H), 2.11 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 189.4, 188.4, 188.3, 173.9, 172.0, 168.6, 168.4, 167.3, 166.5, 164.5, 160.9, 65.4, 54.9 ppm.

5.3.2 Příprava *tert*-butyl 4-(4-((7-methyl-8-oxo-9-(*o*-tolyl)-8,9-dihydro-7*H*-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (B)

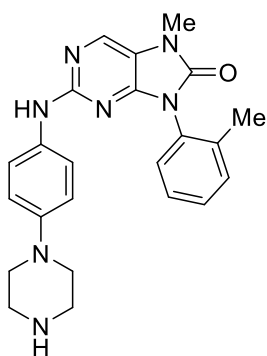


Obrázek č. 8 Struktura látky B

10 mL nádoba určená pro mikrovlnný reaktor byla naplněna sloučeninou **A** (95 mg, 0.35 mmol), aminem **X** (78 mg, 0.28 mmol), K₂CO₃ (193 mg, 1.4 mmol), XPhos Pd G2 (6 mg, 8.10⁻³ mmol), dioxanem (2 mL) a vodou (0.5 mL). Směs byla promíchána a probublána

proudem N₂ a následně vložena na 2 hodiny do mikrovlnného reaktoru (max. 150 W, 100 °C). Poté byla reakce ukončena přidavkem nasyceného roztoku NH₄Cl a extrahována do EtOAc (3 x 10 mL). Po vysušení extraktu pomocí Na₂SO₄ a odpaření rozpouštědel byl produkt čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze: hex/EtOAc 3:1 až 1:1). Rozpouštědla z příslušných frakcí byla odpařena a získala se látka **B** (126 mg, 70 %), která byla použita v další reakci .

5.3.3 Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(*o*-tolyl)-7*H*-purin-8(9*H*)-onu (C)



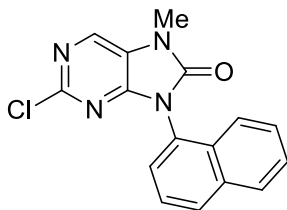
Obrázek č. 9 Struktura látky C

Sloučenina **B** (126 mg, 0.24 mmol) byla rozpuštěna ve směsi MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 4.8 mL), do které byl následně přikapáván 37% roztok HCl (0.4 mL). Reakční směs byla poté promíchávána za laboratorní teploty po dobu 48 hodin. Poté byla reakční směs neutralizována pomocí K₂CO₃ do pH 8, zjištěného pomocí pH papírku, a nanesena na sloupec silikagelu. Produkt byl čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze: MeOH/CH₂Cl₂ 1:5). Po vypaření rozpouštědel se získala žlutooranžová krystalická látka **C** (63 mg, 63 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.11 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.55 – 7.51 (m, 2H), 7.46 – 7.34 (m, 4H), 6.82 – 6.77 (m, 2H), 3.3 (s, 3H), 3.04 – 3.00 (m, 4H), 2.97 – 2.92 (m, 4H), 2.13 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 155.6, 151.7, 150.3, 145.7, 136.5, 133.8, 133.5, 131.8, 130.8, 129.3, 129.2, 126.8, 119.3, 116.7, 116.2, 49.0, 44.6, 27.3, 17.4 ppm.

5.4 Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (F)

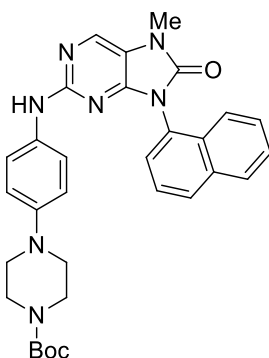
5.4.1 Příprava 2-chlor-7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-7H-purin-8(9H)-onu (D)



Obrázek č. 10 Struktura látky D

Do 50 ml baňky byl přidán Cu_2S (16 mg, 0.10 mmol), MeCN (2 mL) a TMEDA (0.06 mL, 0.40 mmol). Výsledná směs byla míchána za laboratorní teploty 15 minut. Následně byla přidána sloučenina **5** (37 mg, 0.20 mmol) a naftylbornová kyselina **U** (69 mg, 0.40 mmol). Vzniklá reakční směs byla promíchána za přístupu vzduchu za laboratorní teploty 48 hodin. Poté byla reakce ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH_4Cl a EtOAc. Následně byla směs filtrována přes fritu a filtrát byl po odpaření čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1 až 1:2). Po odpaření rozpouštědel se získala směs obsahující látku **D** (40 mg). Tato směs byla použita v následující reakci bez dalšího čištění.

5.4.2 Příprava *tert*-butyl 4-(4-((7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-8-oxo-8,9-dihydro-7H-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (E)

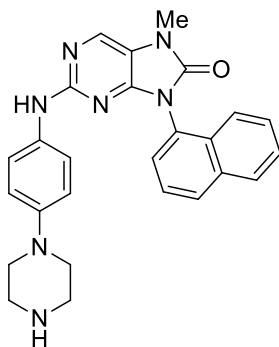


Obrázek č. 11 Struktura látky E

10 mL nádoba určená pro mikrovlnný reaktor byla naplněna směsí obsahující sloučeninu **D** (40 mg, ≈ 0.13 mmol), aminem **X** (34 mg, 0.12 mmol), K_2CO_3 (87 mg, 0.63 mmol), XPhos Pd G2 (3 mg, $4 \cdot 10^{-3}$ mmol), dioxanem (2 mL) a vodou (0,5 mL). Směs byla promíchána a probublána proudem N_2 a následně vložena na 2.5 hodiny do mikrovlnného reaktoru (max. 150 W, 100 °C). Poté byla reakce ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH_4Cl

a extrahována do EtOAc (2x10 mL). Po vysušení extraktu pomocí MgSO₄ a odpaření rozpouštědel byl produkt filtrován přes silikagel a promyt EtOAc. Po odpaření rozpouštědel se získala kontaminovaná látka **E** (67 mg), která byla použita v následující reakci bez dalšího čištění.

5.4.3 Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (**F**)



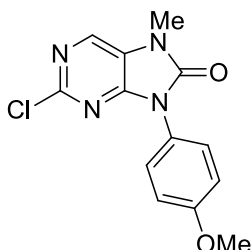
Obrázek č. 12 Struktura látky **F**

Směs obsahující sloučeninu **E** (67 mg, \approx 0.12 mmol) byla rozpuštěna ve směsi MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 2.8 mL), do které byl následně přikapáván 37% roztok HCl (0.25 mL). Reakční směs byla poté promíchávána za laboratorní teploty po dobu 48 hodin. Poté byla reakční směs neutralizována pomocí K₂CO₃ (0.5 g) a byla přidána voda (10 ml). Byla provedena extrakce do EtOAc (1 x 10 mL). Po vysušení extraktu pomocí MgSO₄ a odpaření rozpouštědel byl produkt čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze MeOH/CH₂Cl₂ 1:10 až 1:1). Po vypaření rozpouštědel se získala žlutá krystalická látka **F** (13 mg, 14 % po 3 krocích).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.02 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.15 – 8.12 (m, 1H), 8.11 – 8.08 (m, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 2H), 7.64 – 7.60 (m, 2H), 7.57 – 7.53 (m, 1H), 7.50 – 7.45 (m, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.05 – 3.01 (m, 4H), 2.98 – 2.94 (m, 4H) ppm.

5.5 Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (I)

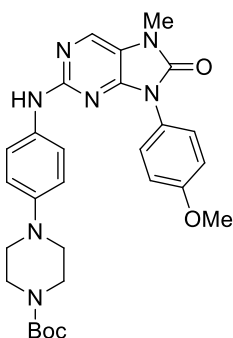
5.5.1 Příprava 2-chlor-9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (G)



Obrázek č. 13 Struktura látky G

Do 50 ml baňky byl přidán Cu_2S (33 mg, 0.21 mmol), MeCN (2 mL) a TMEDA (0.12 mL, 0.81 mmol). Výsledná směs byla míchána za laboratorní teploty 15 minut. Následně byla přidána sloučenina **5** (75 mg, 0.41 mmol) a 4-methoxyfenylboronová kyselina **V** (124 mg, 0.82 mmol). Vzniklá reakční směs byla promíchána za přístupu vzduchu za laboratorní teploty 24 hodin. Následně byla opět přidána 4-methoxyfenylboronová kyselina **V** (125 mg, 0.82 mmol) a směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Poté byla reakce ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH_4Cl a EtOAc. Následně byla směs filtrována přes křemelinu a filtrát byl po odpaření čištěn chromatograficky (silikagel, mobilní fáze MeOH/ CH_2Cl_2 1:500 až 1:50). Produkt **G** byl získán ve formě žluté amorfni směsi (58 mg), která byla použita v následující reakci bez dalšího čištění.

5.5.2 Příprava *tert*-butyl 4-(4-((9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-8-oxo-8,9-dihydro-7H-purin-2-yl)amino)fenyl)piperazin-1-karboxylátu (H)

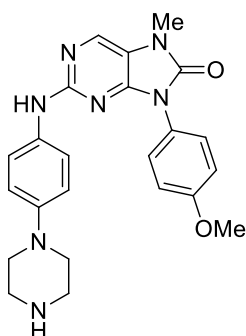


Obrázek č. 14 Struktura látky H

10 mL nádoba určená pro mikrovlnný reaktor byla naplněna směsí obsahující sloučeninu **G** (58 mg, ≈ 0.20 mmol), aminem **X** (44 mg, 0.16 mmol), K_2CO_3 (111 mg, 0.80 mmol), XPhos Pd G2 (3 mg, 4.10^{-3} mmol), dioxanem (2 mL) a vodou (0,5 mL). Směs byla vložena

na 2.5 hodiny do mikrovlnného reaktoru (max. 150 W, 100 °C). Do reakční směsi byl následně přidán amin **X** (12 mg, 0.04 mmol) a směs byla umístěna opět do mikrovlnného reaktoru (max. 150 W, 100 °C) na 2 h. Poté byla reakce ukončena přidavkem nasyceného roztoku NH₄Cl a extrahována do EtOAc (1x10 mL). Po odpaření rozpouštědel byla reakční směs čištěna chromatograficky (silikagel, CH₂Cl₂/MeOH 40:1 až 20:1). Po odpaření rozpouštědel se získala hnědá směs (92 mg) obsahující látku **H**, která byla použita v následujícím kroku bez dalšího čištění.

5.5.3 Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (**I**)



Obrázek č. 15 Struktura látky **I**

Směs obsahující sloučeninu **H** (92 mg, \approx 0.17 mmol) byla rozpuštěna ve směsi MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 2.8 mL), do které byl následně přikapáván 37% roztok HCl (0.29 mL). Reakční směs byla poté promíchávána za laboratorní teploty po dobu 48 hodin. Poté byla reakční směs neutralizována pomocí K₂CO₃ do pH 8. Po odpaření rozpouštědel byl produkt rozpuštěn v EtOH (5 mL) a filtrován za promytí EtOH (20 mL). Filtrát byl následně chromatograficky čištěn (silikagel, mobilní fáze MeOH/CH₂Cl₂ 3:20 až 1:5). Po odpaření rozpouštědel se získala látka **I** ve formě žluté amorfnní látky (44 mg, 25 % po 3 krocích).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.09 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.59 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.50 (m, 2H), 7.13 – 7.09 (m, 2H), 6.86 – 6.81 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.10 – 3.05 (m, 4H), 3.01 – 2.97 (m, 4H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 158.7, 155.5, 152.0, 150.0, 145.4, 133.9, 133.7, 128.0, 125.5, 119.3, 116.4, 116.3, 114.2, 55.5, 48.5, 44.2, 27.3 ppm.

6 Diskuze a výsledky

6.1 Příprava 2-chlor-7-methyl-7H-purin-8(9H)-onu (5)

Sloučenina **5**, která sloužila jako výchozí látka pro CEL coupling, se získávala prostřednictvím tříkrokové syntézy (schéma č. 14). Nejprve se z chloridu **1** a aminu **2** získala látka **3** ve výtěžku 76 %. Následnou cyklizací diaminu **3** fosgenem byl připraven purinový derivát **4** ve výtěžku 55 %. Problémový se jevil třetí krok, kdy se z látky **4** měla odstranit chránící 2,6-dimethoxybenzyl skupina v kyselém prostředí. Deprotekce pomocí trifluoroctové kyseliny sice probíhala s vysokou konverzí, avšak problematická byla izolace samotného purinového derivátu **5**. Reakční produkt se ze směsi obsahující velké množství TFA špatně izoloval, a navíc chlor v poloze 2 byl náchylný k hydrolyze, což ještě více komplikovalo izolaci. Proto byl výtěžek sloučeniny **5**, získané v podobě bílé amorfní látky, ve třetím kroku poměrně nízký (51 %).

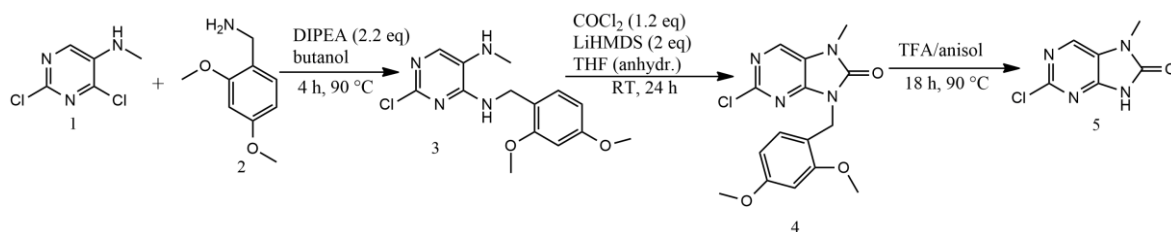


Schéma č. 14 Syntéza výchozí látky

6.2 Příprava 7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-9-(*o*-tolyl)-7H-purin-8(9H)-onu (C)

N-arylovaný derivát **A** byl připraven CEL couplingem purinu **5** (92 mg, 0.5 mmol) s *o*-tolylbornovou kyselinou **T**. Reakční podmínky byly převzaty z dříve publikované práce, využívající sulfidu měďného v kombinaci s ligandem TMEDA (32). N-arylace proběhla s vysokou konverzí a žádaný produkt **A** byl izolován ve výtěžku 88 %. V následujícím kroku sloučenina **A** reagovala s aminem **X** dle Buchwald-Hartwigovy aminace za vzniku látky **B**. Aminace byla provedena za vyšší teploty v mikrovlnném reaktoru za katalýzy XPhos Pd G2, v přítomnosti uhličitanu draselného a ve směsi rozpouštědel dioxan-voda. I tato reakce probíhala s vysokou konverzí a výsledný produkt **B** se podařilo izolovat ve výtěžku 70 %. Deprotekcí Boc skupiny látky **B** kyselinou chlorovodíkovou byl připraven finální purinový derivát **C**, v podobě žlutooranžové krystalické látky, pro biologické testování ve výtěžku 63 % (schéma č. 15).

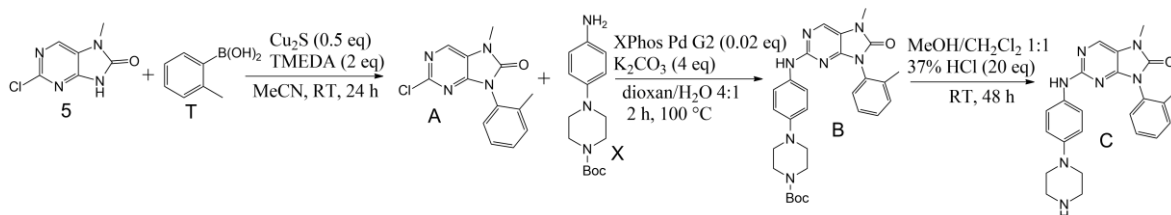


Schéma č. 15 Syntéza látky C

6.3 Příprava 7-methyl-9-(naftalen-1-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (F)

Naftylový derivát **F** byl získán sledem reakcí za identických podmínek jako sloučenina **C** (viz kapitola 6.2). Zde se ukázal problematický CEL coupling s 1-naftylboronovou kyselinou **U**, který vedl ke směsi látek. Zároveň v reakční směsi zůstala neodreagovaná výchozí látka **5**. Přesto se podařilo produkt **D**, ač znečištěný, izolovat a podrobit ho dalším krokům aminace a deprotektce (schéma č. 16). Konečný purinový produkt **F** pro biologické testování byl získán čistý jako žlutá krystalická látka po třech krocích v celkovém výtěžku 14 %.

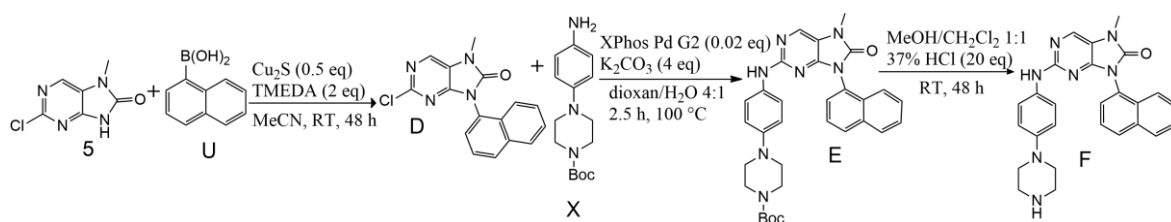


Schéma č. 16 Syntéza látky F

6.4 Příprava 9-(4-methoxyfenyl)-7-methyl-2-((4-(piperazin-1-yl)fenyl)amino)-7H-purin-8(9H)-onu (I)

Látka **I** N-substituovaná 4-methoxyfenylovou skupinou byla připravena sledem tří reakčních kroků za identických podmínek jako derivát **C** (viz. kapitola 6.2). Problematickou se opět ukázala být CEL reakce s 4-methoxyfenylboronovou kyselinou **V**, poněvadž nedošlo ke kompletnímu odreagování výchozí látky **5**. Po obvyklém zpracování a filtraci přes silikagel byla surová nedočistěná látka **G** podrobena dalším krokům (schéma č. 17). Výsledný purinový derivát **I** byl získán pro biologické testování čistý jako žlutá amorfnní látka v celkovém výtěžku 25 %.

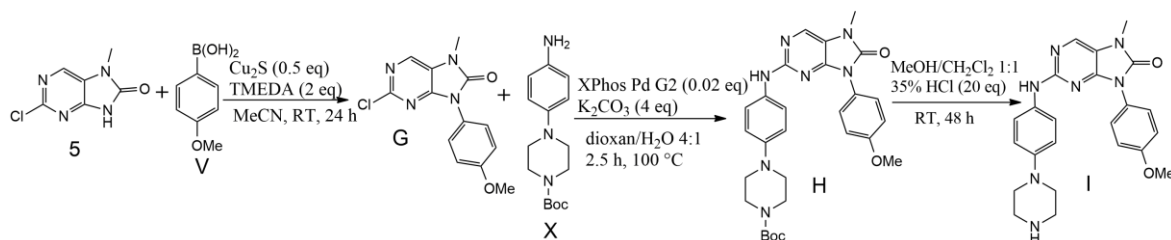
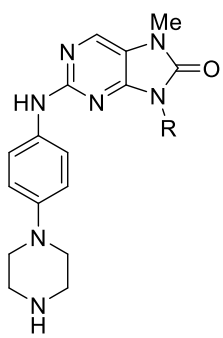
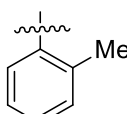
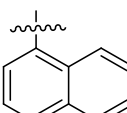
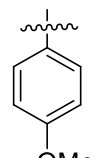


Schéma č. 17 Syntéza látky I

7 Inhibice CDK a cytotoxicita

Všechny tři připravené purinové deriváty **C**, **F** a **I** byly testovány na externím pracovišti. Zkoumána byla inhibice aktivity enzymů z řady cyklin-dependentních kinas, a to CDK2 aktivovaných cyklinem E a CDK4 s vazebným partnerem cyklinem D1. Dále byla testována protinádorová aktivita na třech buněčných liniích, MV4-11, K562 a MCF-7. Obecně jsou všechny hodnoty GI50, značící koncentraci látky, která je schopna inhibovat 50 % buněčného dělení nádorových buněk, nebo IC50, značící koncentraci, při níž látka inhibuje 50 % aktivity cílového enzymu, menší než 1 μM považovány za zajímavý výsledek (9). Naftylový derivát **F** neprokázal dostatečné biologické účinky. Oba zbývající purinové deriváty prokázaly zajímavou biologickou aktivitu, a to jak při inhibici enzymů, tak i při inhibici růstu nádorových buněk. Purin **I** s 4-methoxyfenylovou skupinou prokázal o něco lepší aktivitu při inhibici CDK4 než 2-methylfenyl derivát **C** a zároveň i nejlépe inhiboval buněčný růst na všech testovaných buněčných liniích (tabulka č.1).

						
Látka	Substituent R	Buněčná linie, GI50 (μM)			Inhibice enzymů, IC50 (μM)	
		MV4-11	K562	MCF-7	CDK2/E	CDK4/D1
C		1.25	16.71	25.75	0.54	1.87
F		>50	>50	>50	>50	>50
I		0.4	1.97	5.19	6.18	0.49

Tabulka č. 1 Výsledky cytotoxicity připravených látek

8 Závěr

Práce zdokumentovala přípravu tří potenciálních purinových CDK inhibitorů pomocí tříkrokové syntézy sestávající z CEL reakce, Buchwald-Hartwig couplingu a deprotektce ochranné Boc skupiny. Naše práce se orientovala primárně na enzym CDK4, jenž má za vazebného partnera cyklin D. Inhibicí CDK4 lze narušit genovou expresi přechodu G1/S buněčného cyklu, a tak zabránit možné proliferaci nádorových buněk.

Celkově bylo připraveno 9 meziproduktů a 3 finální produkty. Výchozí purin **5** pro syntézu byl připraven také prostřednictvím tříkrokové syntézy. Finální purinové deriváty pro biologické experimenty byly připraveny syntézou započatou CEL reakcí s arylboronovou kyselinou katalyzovanou Cu_2S v přítomnosti TMEDA ligandu. Následovala Buchwald-Hartwigova aminace s příslušným aminem **X**, jež byla katalyzována XPhosPd G2, a reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru. Zakončení celé syntézy představovala deprotektce Boc skupiny prostřednictvím HCl.

Biologická aktivita zde popsaných připravených purinů, přesně schopnost inhibovat CDK2, CDK4 a schopnost inhibovat růst nádorových buněk, byla již otestována na externím pracovišti. Největší schopnosti inhibice CDK4 prokázal purin **I**, který byl ale méně aktivní při inhibici CDK2 oproti purinu **C**. Purin **I** také inhiboval proliferaci nádorových buněk všech 3 testovaných buněčných linií nejlépe. Naftylový derivát **F** není schopen dle provedených testů dostatečně inhibovat testované CDK.

Ke zlepšení schopnosti inhibice CDK4 by se mohlo v budoucím výzkumu dosáhnout např. obměněním aminu, který se na výchozí látku **5** vázal během Buchwald-Hartwigovy reakce nebo obměněním arylboronových kyselin za takové, které obsahují více heteroatomů.

9 Citovaná literatura

1. **MANNING, G., a další.** The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002, Sv. 298, 5600.
2. **ASHGAR, Uzma, a další.** The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015, Sv. 14, 2.
3. **UBERSAX, Jeffrey A., a další.** Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 2003, Sv. 425, 6960.
4. **MORGAN, David O.** CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997, Sv. 13.
5. **DE BONDT, Hendrik L., a další.** Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 1993, Sv. 363, 6430, stránky 500–506.
6. **SÁNCHEZ-MARTINÉZ, Concepción , a další.** Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors as Anticancer Drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, Sv. 25, 17.
7. **SHERR, Charles J. a ROBERTS, James M.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *GENES & DEVELOPMENT*. 1999, Sv. 13, 12.
8. **SHERR, Charles J. a MCCORMICK, Frank.** The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002, Sv. 2, 2.
9. **YUAN, Kai , a další.** Selective inhibition of CDK4/6: a safe and effective strategy for developing anticancer drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021, Sv. 11, 1.
10. **LE TOURNEAU, Christophe, a další.** Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer*. 2010, Sv. 46, 18.
11. **VESELÝ, Jaroslav, a další.** Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry*. 1994, Sv. 224, 2.
12. **AZZOPARDI, Stephanie, a další.** p53 and p16Ink4a/p19Arf Loss Promotes Different Pancreatic Tumor Types from PyMT-Expressing Progenitor Cells. *Neoplasia*. 2016, Sv. 18, 10.
13. **COLLEONI, B., a další.** JNKs function as CDK4-activating kinases by phosphorylating CDK4 and p21. *Oncogene*. 2017, Sv. 36, 30.

14. **EGGERSMANN , Tanja K., a další.** CDK4/6 Inhibitors Expand the Therapeutic Options in Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *BioDrugs*. 2019, Sv. 33, 2.
15. **LAM, Patrick Y. S., a další.** New Aryl/Heteroaryl C-N Bond Cross-coupling Reactions via Arylboronic Acid/Cupric Acetate Arylation. *Tetrahedron Letters*. 1998, Sv. 39, 19.
16. **CHAN, Dominic M.T., a další.** New N- and O-arylations with phenylboronic acids and cupric acetate. *Tetrahedron Letters*. 1998, Sv. 39, 19.
17. **EVANS, David A., KATZ, Jeffrey L. a WEST, Theodore R.** Synthesis of diaryl ethers through the copper-promoted arylation of phenols with arylboronic acids. An expedient synthesis of thyroxine. *Tetrahedron Letters*. 1998, Sv. 39, 9.
18. **VANTOUROUT, Julien C., a další.** Spectroscopic Studies of the Chan–Lam Amination: A Mechanism-Inspired Solution to Boronic Ester Reactivity. *Journal of the American Chemical Society*. 2017, Sv. 139, 13.
19. **MOON, Patrick J., HALPERIN, Heather M. a LUNDGREN, Rylan J.** Oxidative Coupling of Aryl Boron Reagents with sp³-Carbon Nucleophiles: The Enolate Chan–Evans–Lam Reaction. *Angewandte Chemie*. International Edition, 2016, Sv. 55, 5.
20. **CHEN, Jin-Quan, LI, Jing-Hang a DONG, Zhi-Bing.** A Review on the Latest Progress of Chan-Lam Coupling Reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2020, Sv. 362, 16.
21. **QIAO, Jennifer X. a LAM, Patrick Y. S.** Copper-Promoted Carbon–Heteroatom Bond Cross-Coupling with Boronic Acids and Derivatives. *Synthesis*. 2011, Sv. 2011, 6.
22. **BAJAN, Sarah a HUTVAGNER, Gyorgy .** RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*. 2020, Sv. 9, 1.
23. **LAM, Patrick Y.S., a další.** Structure-based design of novel guanidine/benzamidine mimics: potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors as novel anticoagulants. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003, Sv. 46, 21.
24. **GURAM, Anil S., RENNELS, Roger A. a BUCHWALD, Stephen L.** A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angewandte Chemie*. International Edition, 1995, Sv. 34, 12.
25. **LOUIE, Janis a HARTWIG, John F.** Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents. *Tetrahedron Letters*. 1995, Sv. 36, 21.

26. **DOREL, Ruth, GRUGEL, Christian P. a HAYDL, Alexander M.** The Buchwald–Hartwig Amination After 25 Years. *Angewandte Chemie. International Edition*, 2019, Sv. 58, 48.
27. **MANN, Grace, a další.** Palladium-Catalyzed C–O Coupling Involving Unactivated Aryl Halides. Sterically Induced Reductive Elimination To Form the C–O Bond in Diaryl Ethers. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, Sv. 121, 13.
28. **FORERO-CORTÉS, Paola A. a HAYDL, Alexander M.** The 25th Anniversary of the Buchwald–Hartwig Amination: Development, Applications, and Outlook. *Organic Process Research & Development*. 2019, Sv. 23, 8.
29. **WALTER, Harald, a další.** Sedaxane, Isopyrazam and Solatenol™: Novel Broad-spectrum Fungicides Inhibiting Succinate Dehydrogenase (SDH) - Synthesis Challenges and Biological Aspects. *Chimia* . 2015, Sv. 69, 7-8.
30. **KU, Yi-Yin, a další.** Development of a Convergent Large-Scale Synthesis for Venetoclax, a First-in-Class BCL-2 Selective Inhibitor. *The Journal of Organic Chemistry*. 2019, Sv. 84, 8.
31. **AFFOUARD, Caroline , a další.** Multi-Kilo Delivery of AMG 925 Featuring a Buchwald–Hartwig Amination and Processing with Insoluble Synthetic Intermediates. *Organic Process Research & Development*. 2015, Sv. 19, 3.
32. **JANÍKOVÁ, Kateřina, a další.** Chan-Lam cross-coupling reaction based on the Cu₂S/TMEDA system. *Tetrahedron*. 2018, Sv. 74, 5.

10 Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
Boc	Terc-butyloxykarbonylová skupina
CDCl ₃	Deuterovaný chloroform
CDK	Cyklin dependentní kinasy
CDK1	Cyklin dependentní kinasy 1
CDK2	Cyklin dependentní kinasy 2
CDK4	Cyklin dependentní kinasy 4
CDK6	Cyklin dependentní kinasy 6
CEL	Chan-Evans-Lam reakce
CIP/KIP	S cyklin dependentními kinasami interagující protein/kinasy inhibující protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Skupina transkripčních faktorů DP
E2F	Skupina transkripčních faktorů E2F
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FLT3	FMS-Like Tyrosine kinasa 3
FXa	Aktivovaný faktor X
GI50	Poloviční inhibice buněčné proliferace
Hex	Hexan
HPLC/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
IC50	Poloviční inhibiční koncentrace

INK4	Inhibitory cyklin dependentních kinas 4
IR	Infračervené záření
K562	Buněčná linie
MCF-7	Buněčná linie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MV4-11	Buněčná linie
NMR	Spektroskopie nukleární magnetické rezonance
OH	Hydroxylová skupina
pRb	Retinoblastomový protein
siRNA	Malá interferující ribonukleová kyselina
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
XPhosPd G2	Druhá generace prekatalyzátoru: chlor(2-dicyclohexylfosfino-2',4',6'-triisopropyl-1,1'-bifenyl)[2-(2'-amino-1,1'-bifenyl)]palladium(II)

11 Seznam obrázků

Obrázek č. 1 CDK, cykliny, které je aktivují, a fáze buněčného cyklu, jež ovlivňují.....	8
Obrázek č. 2 Struktury léčiv inhibujících cyklin dependentní kinasy: palbociclib, ribociclib, abemaciclib, olomoucín, seliciclib	9
Obrázek č. 3 Struktury uvedených inhibitorů první a druhé generace: flavopiridol, rivociclib, roniciclib.....	10
Obrázek č. 4 Struktura látky 3	16
Obrázek č. 5 Struktura látky 4	17
Obrázek č. 6 Struktura látky 5	17
Obrázek č. 7 Struktura látky A	18
Obrázek č. 8 Struktura látky B	18
Obrázek č. 9 Struktura látky C	19
Obrázek č. 10 Struktura látky D	20
Obrázek č. 11 Struktura látky E.....	20
Obrázek č. 12 Struktura látky F.....	21
Obrázek č. 13 Struktura látky G.....	22
Obrázek č. 14 Struktura látky H.....	22
Obrázek č. 15 Struktura látky I.....	23

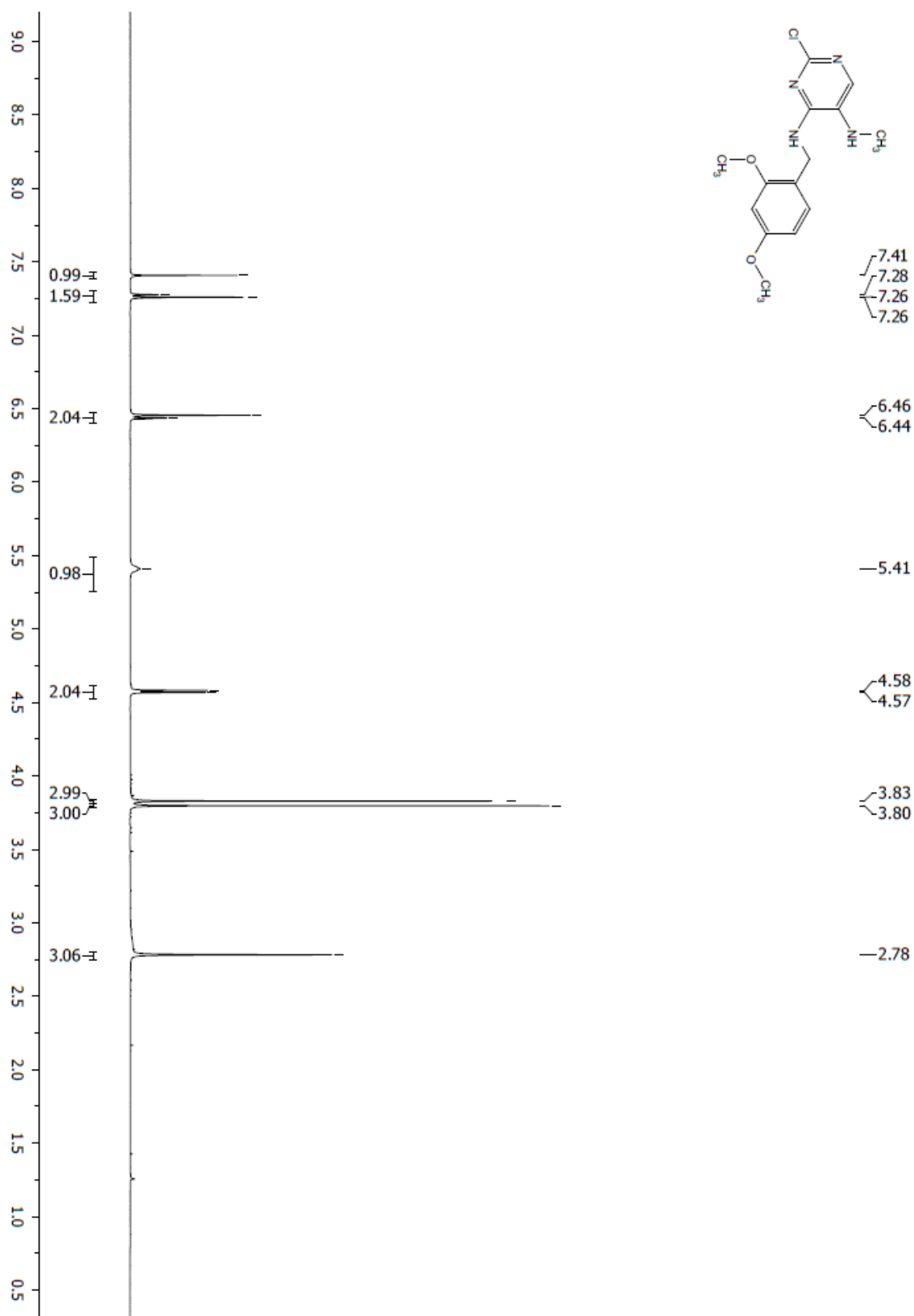
12 Seznam schémat

Schéma č. 1 6kroková syntéza přípravy potenciálních CDK inhibitorů	6
Schéma č. 2 Fosforylace serinu fosfátem z ATP	7
Schéma č. 3 Všeobecné reakční schéma Chan-Evans-Lam couplingu	11
Schéma č. 4 Mechanismus CEL reakce	11
Schéma č. 5 N9-arylace 2,6-dichlorpurinu CEL reakcí.....	12
Schéma č. 6 Arylace adeninu a cytosinu prostřednictvím CEL couplingu	12
Schéma č. 7 Příprava FXa inhibitoru	13
Schéma č. 8 CEL reakce využitá při přípravě atropisomerů	13
Schéma č. 9 Obecné schéma Buchwald-Hartwig aminace.....	14
Schéma č. 10 Mechanismus Buchwald-Hartwig aminace.....	14
Schéma č. 11 Buchwald-Hartwigova aminace využitá při výrobě sedaxanu.....	15
Schéma č. 12 Buchwald-Hartwigova aminace využitá při výrobě venetoclaxu	15
Schéma č. 13 Buchwald-Hartwigova aminace využitá při přípravě AMG 925	15
Schéma č. 14 Syntéza výchozí látky	24
Schéma č. 15 Syntéza látky C	24
Schéma č. 16 Syntéza látky F.....	25
Schéma č. 17 Syntéza látky I.....	25

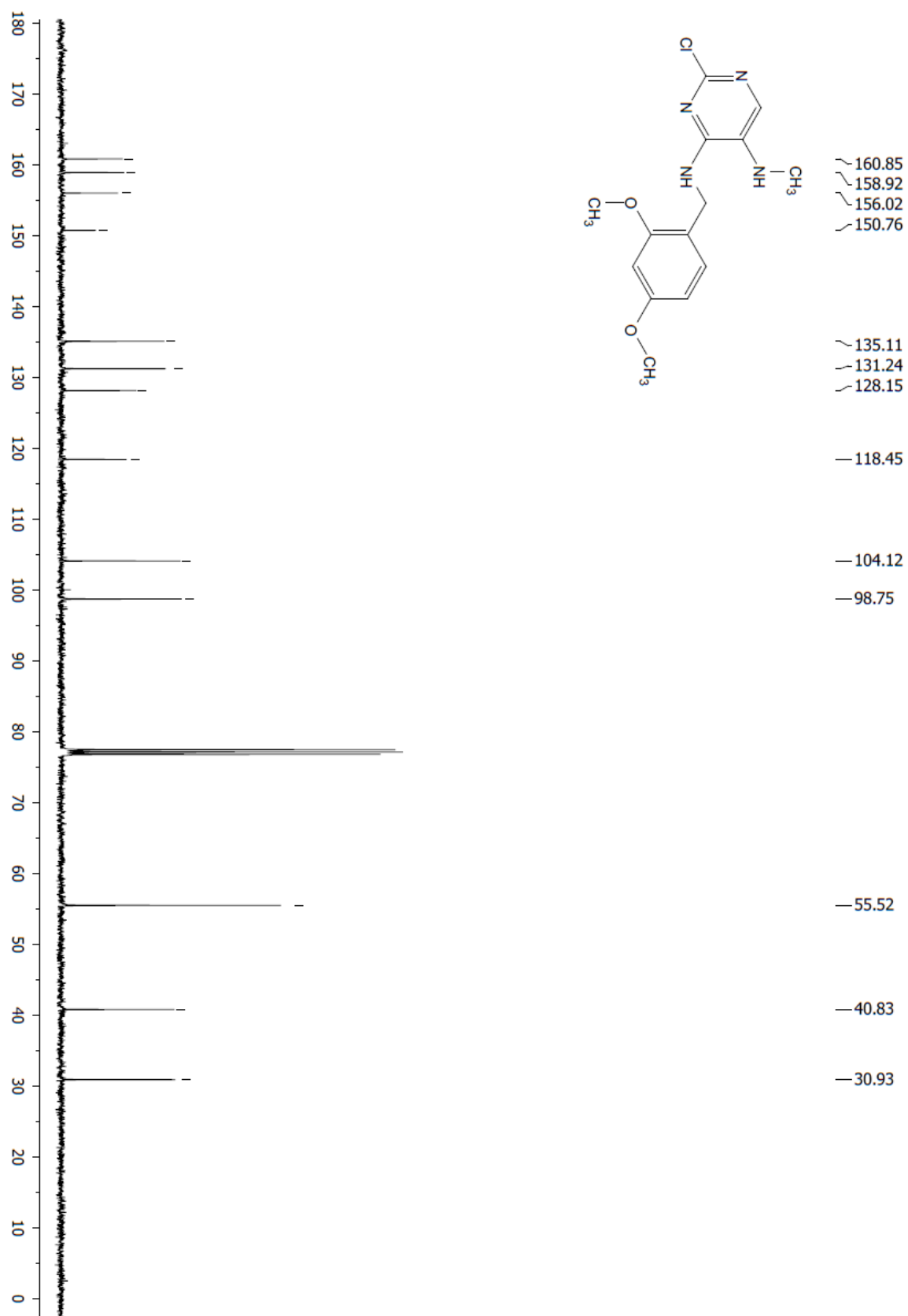
13 Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Výsledky cytotoxicity připravených látek	26
---	----

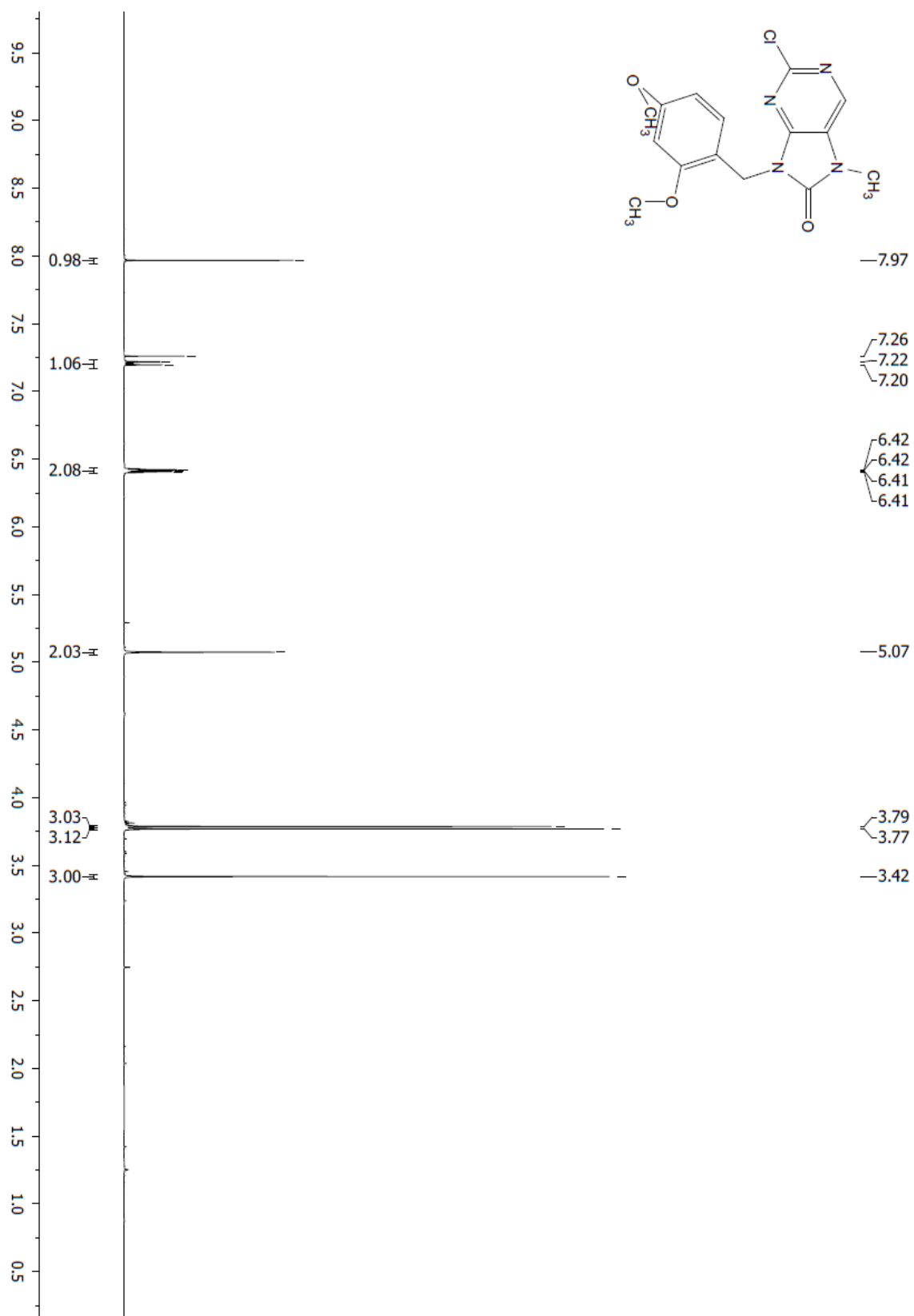
14 Příloha 1: NMR spektra



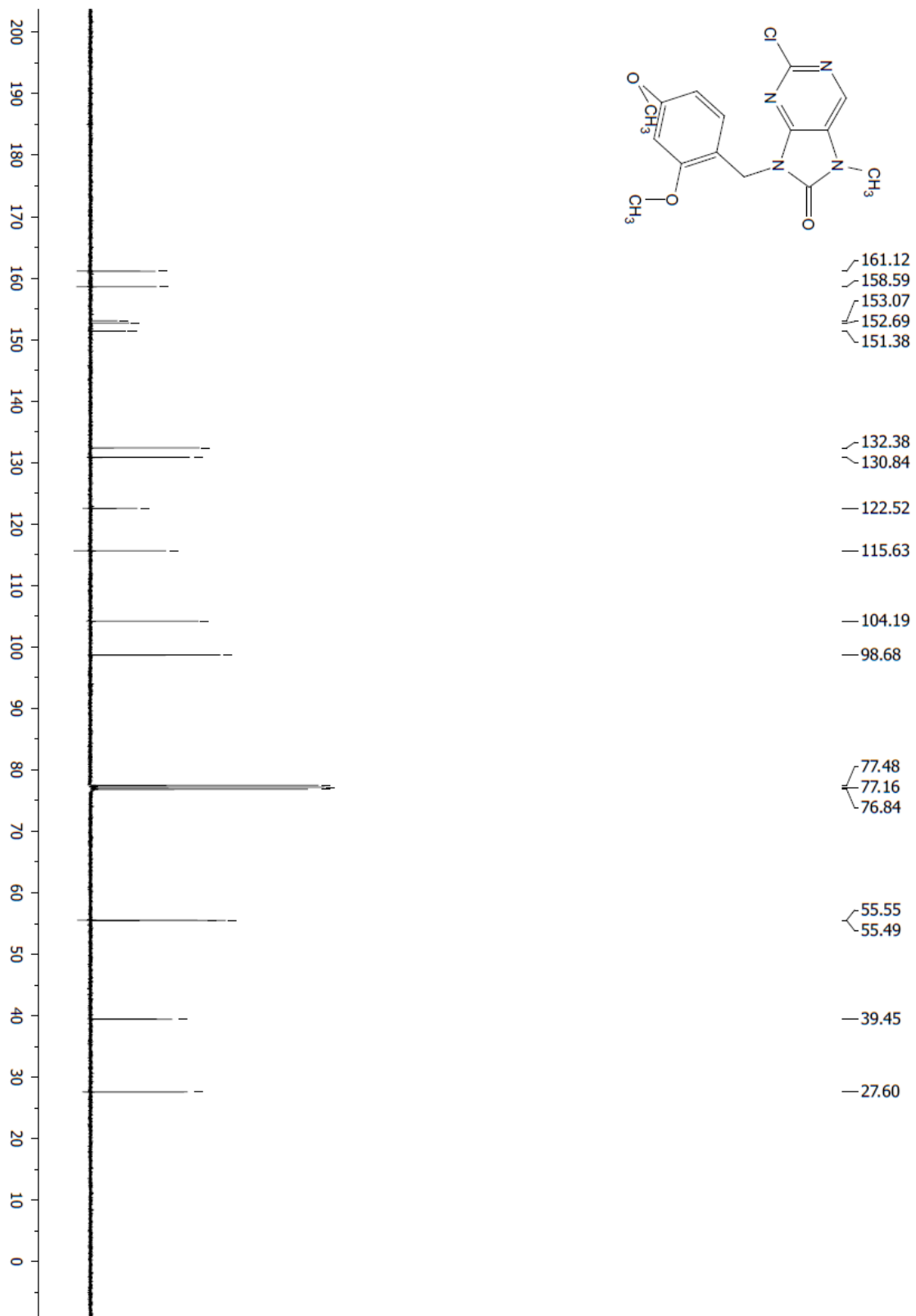
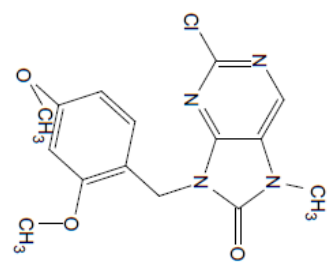
1 NMR ^1H látky 3



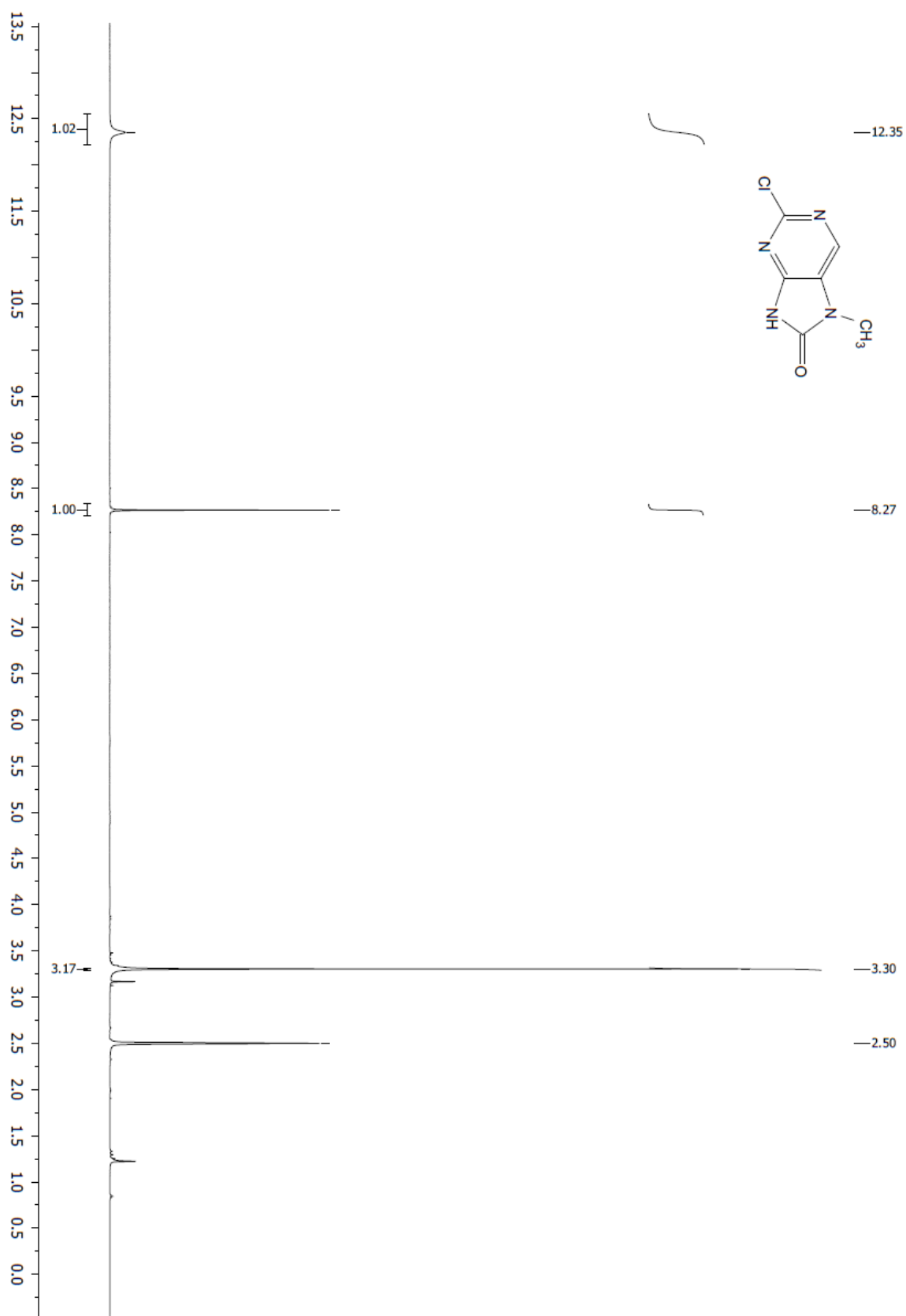
2 NMR ^{13}C látky 3



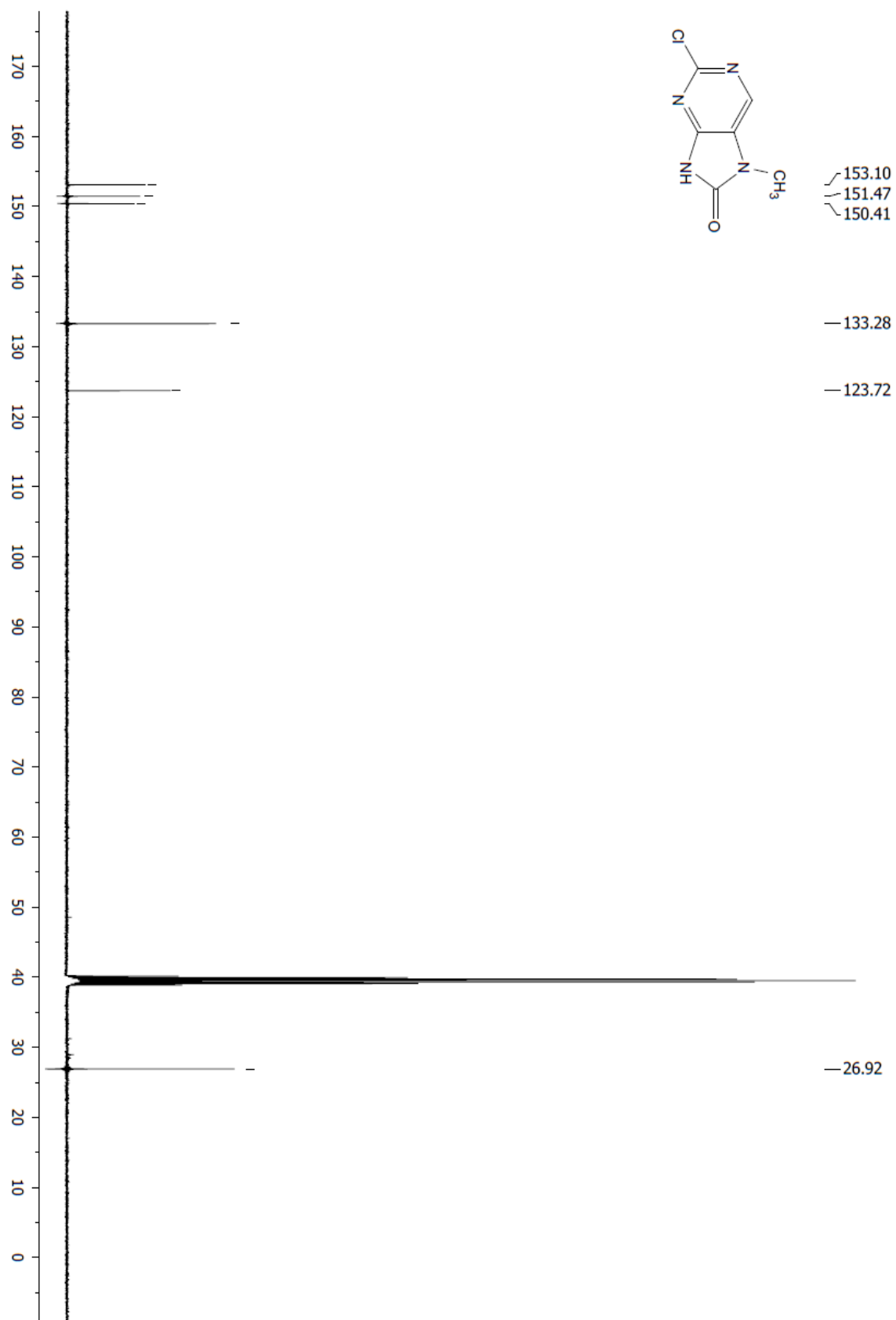
3 NMR ¹H látky 4



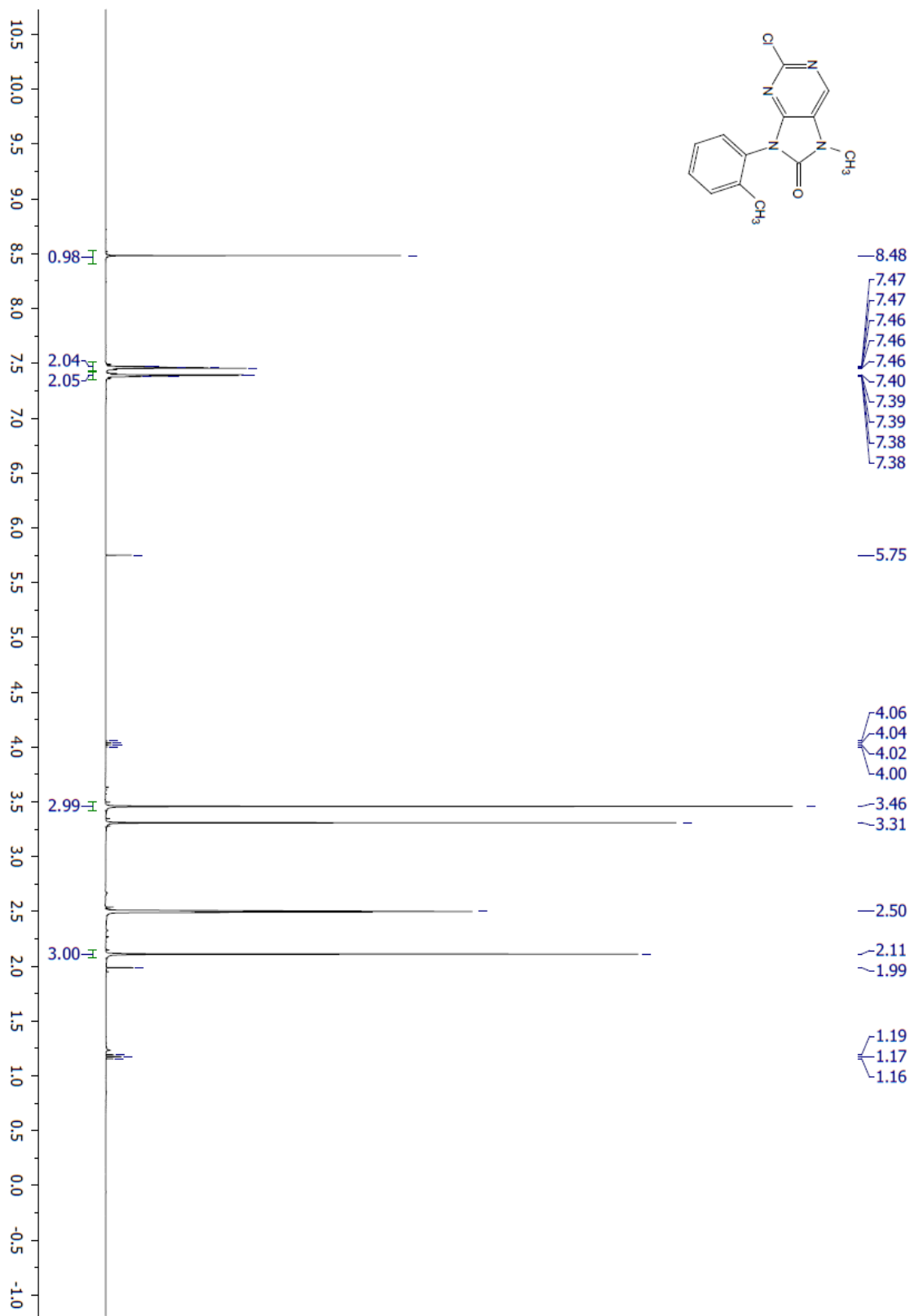
4 NMR ¹³C látky 4



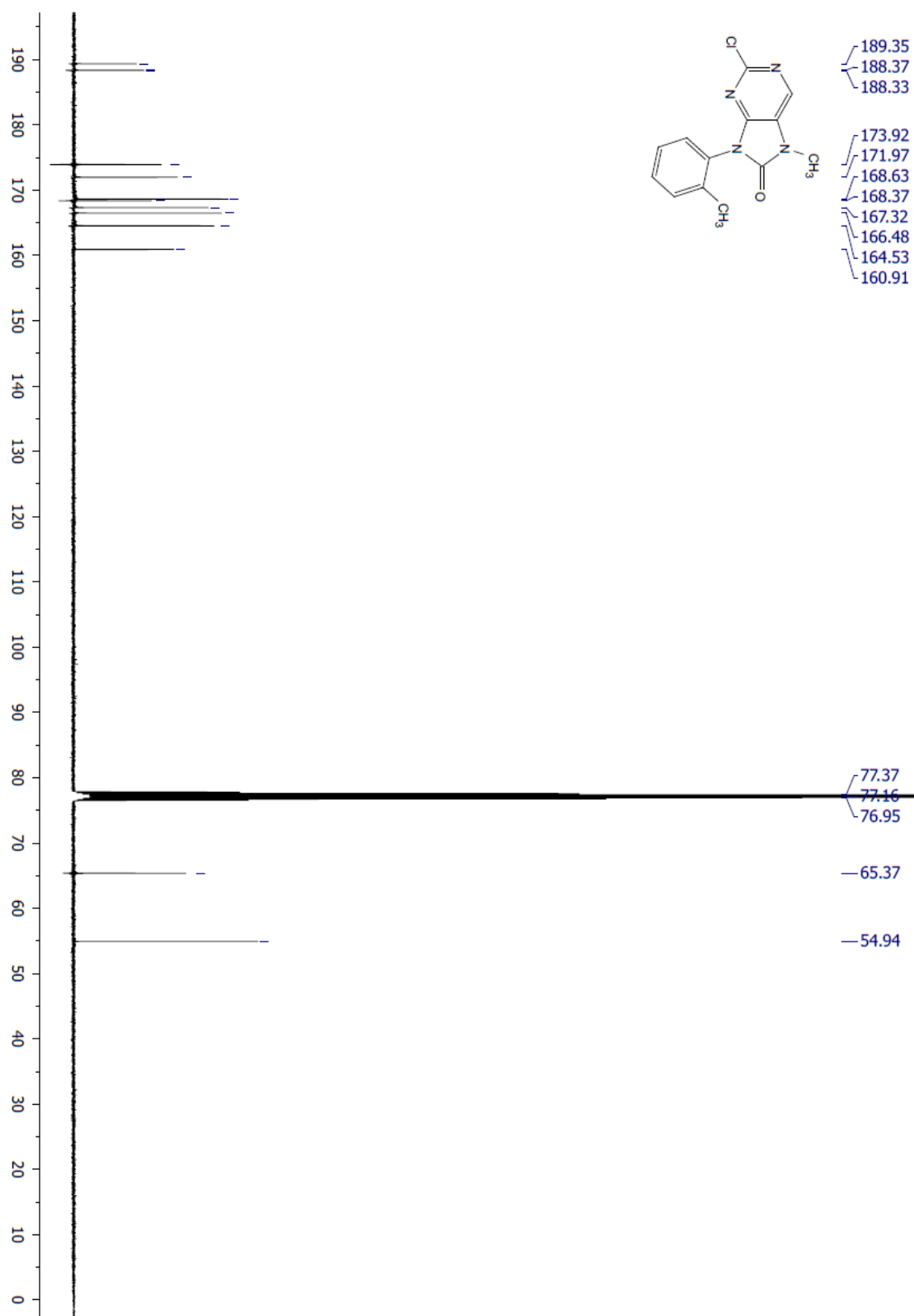
5 NMR ^1H látky 5



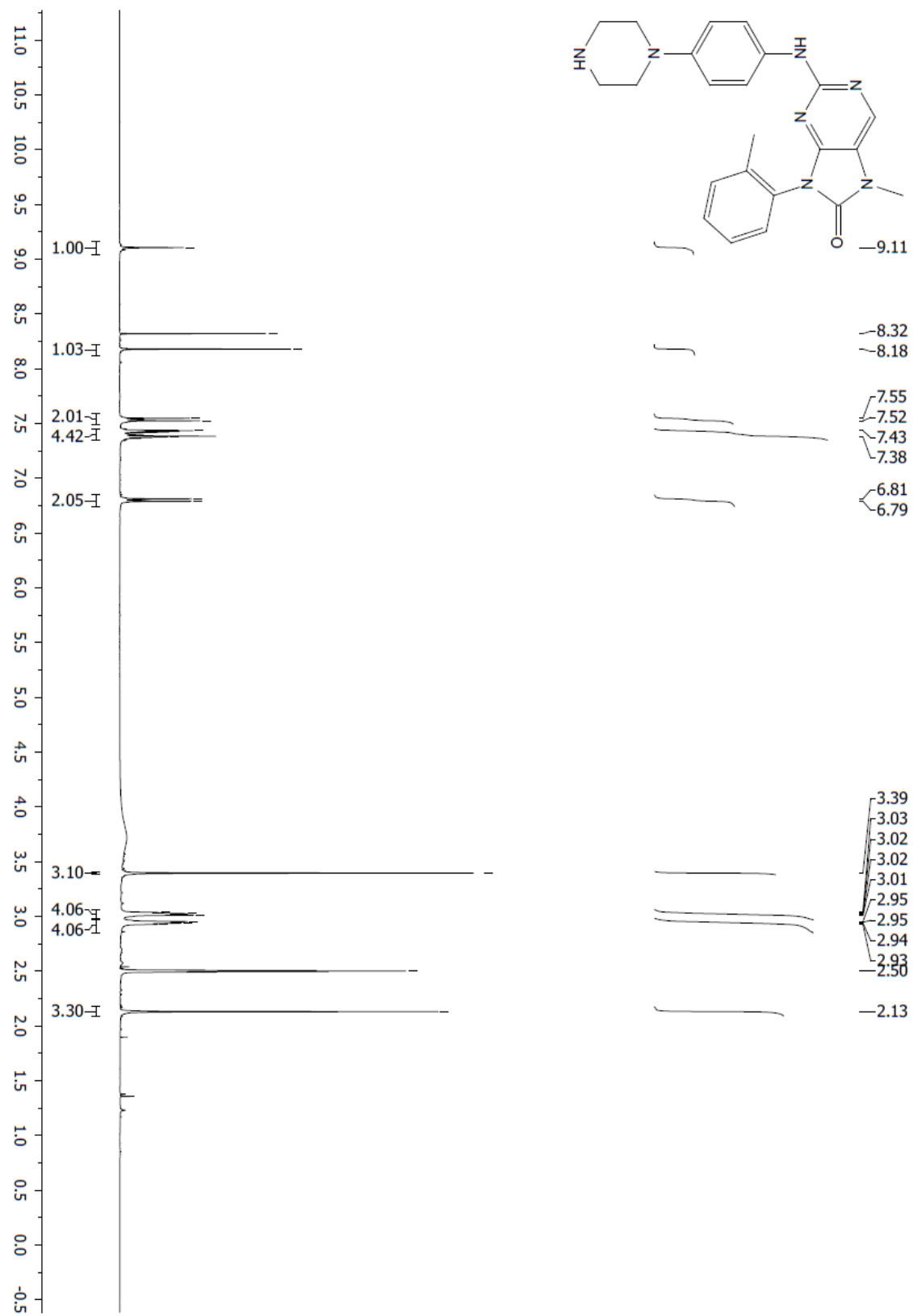
6 NMR ^{13}C látky 5



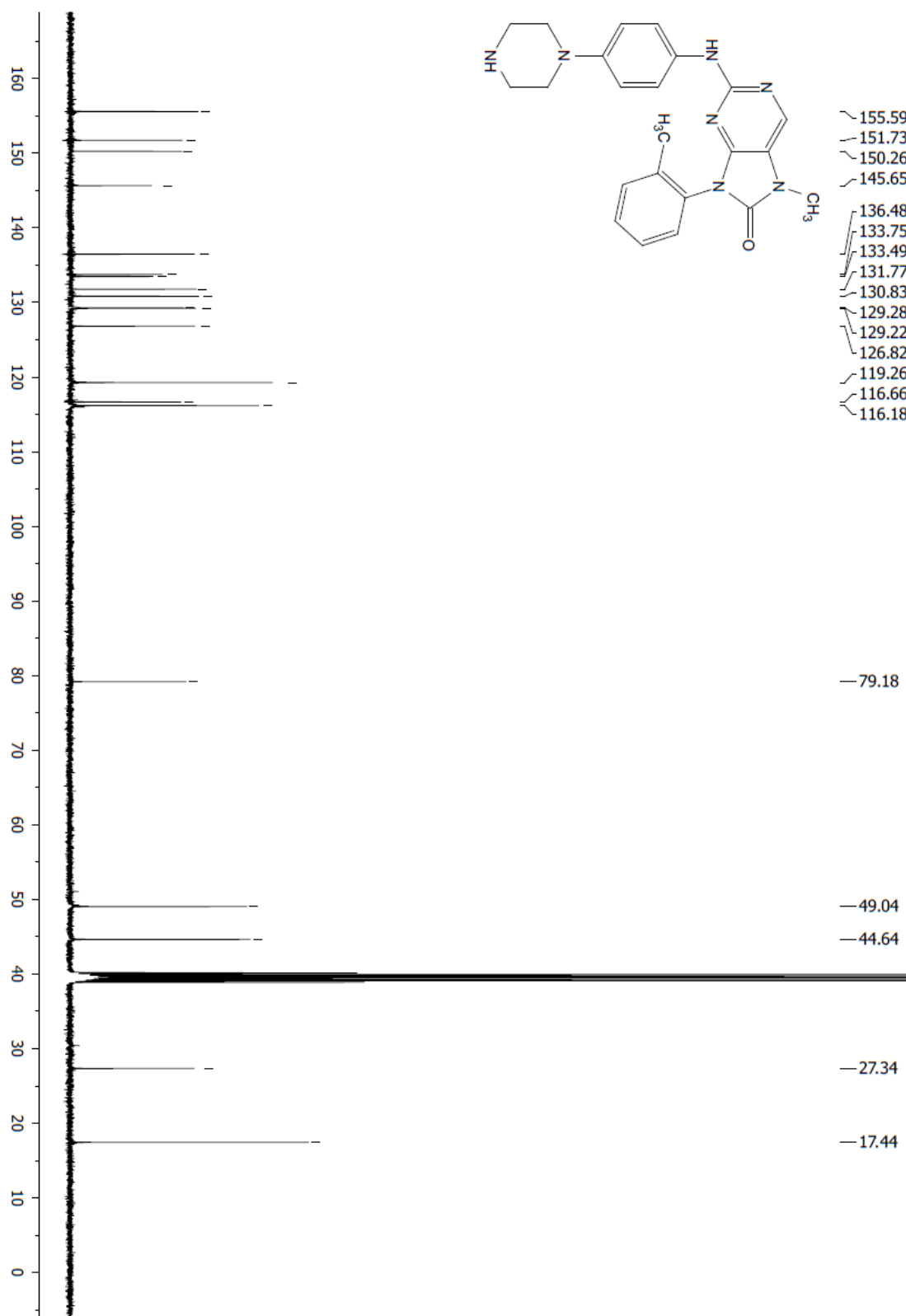
7 NMR ¹H látky A



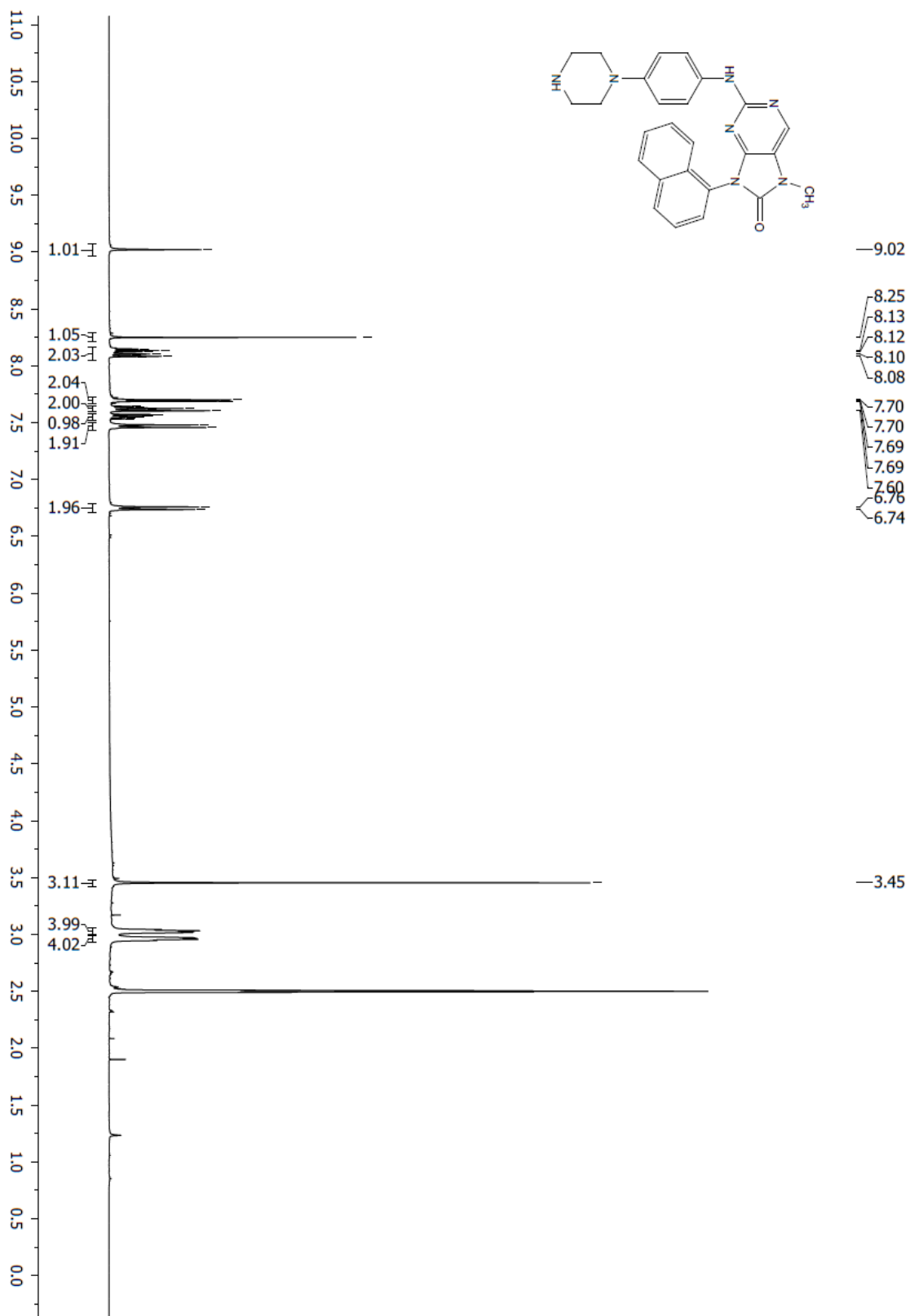
8 NMR ^{13}C látky A



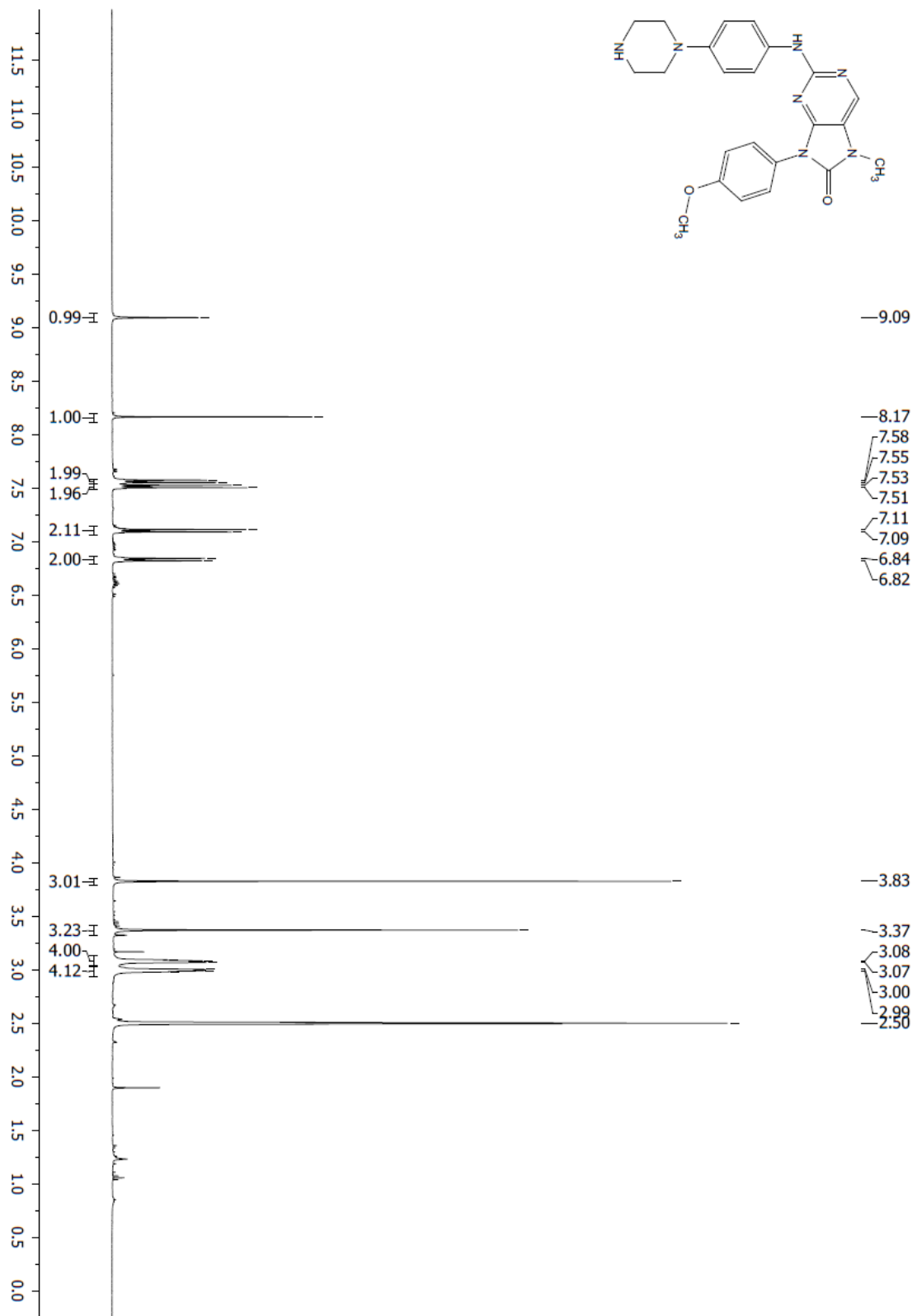
9 NMR ¹H látky C



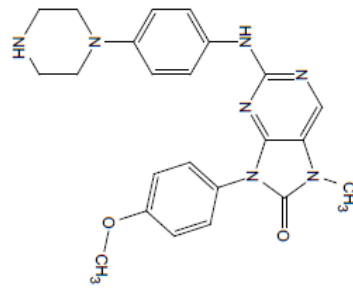
10 NMR ¹³C látky C



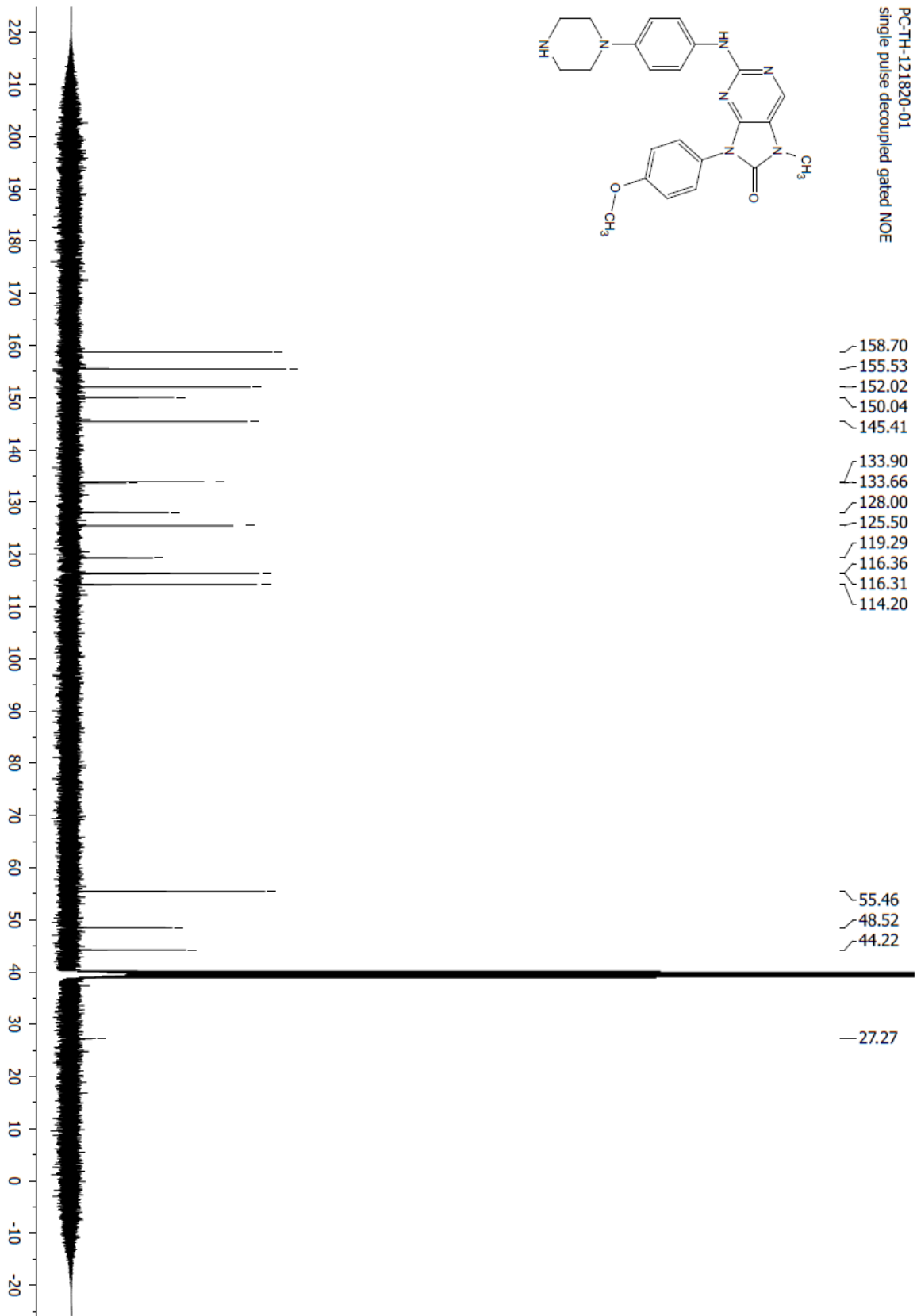
11 NMR ¹H látky F



12 NMR ¹H látky I



PC-TH-121820-01
single pulse decoupled gated NOE



13 NMR ¹³C látky I