

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Syntéza nových selektivně-duálních inhibitorů cyklin dependentních kináz

Janis Bojko
Moravskoslezský kraj

Karviná 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

**Syntéza nových selektivně-duálních inhibitorů cyklin
dependentních kináz**

**Synthesis of new selective-dual inhibitors of cyclin-
dependent kinases**

Autor: Janis Bojko

Škola: Gymnázium Františka Živného, Jana Palacha 794,
735 81 Bohumín

Kraj: Moravskoslezský kraj

Konzultant: Mgr. *et* Mgr. Monika Tomanová
Mgr. Lukáš Jedinák, Ph.D.

Life is a hint of the Eternal.

Albert Hofmann

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

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

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování 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 Karviné dne 13.3.2023

Janis Bojko

Poděkování

Velmi rád bych poděkoval svým vedoucím Mgr. Lukáši Jedinákovi, Ph.D., za skvělé zaškolení a úvod do organické syntézy při počátku práce v laboratořích a při manipulaci s analytickými a laboratorními přístroji a Mgr. et Mgr. Monice Tomanové za obrovskou ochotu při přebírání a dokončování projektu, za přátelský přístup a cenné profesní rady, díky kterým bylo možno dotáhnout projekt zdárně do konce.

Nemalé poděkování je taktéž věnováno vedoucímu výzkumné skupiny doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D., za mé přijetí jakožto člena týmu, RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D., za poskytnutí kvalitně změřených HRMS spekter a RNDr. Naděždě Cankařové, Ph.D., za skvělé zaškolení při práci na semipreparativním HPLC, při přípravě vzorků pro biologické testování.

Současně bych poděkoval i Katedře Organické Chemie Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí skvělého zázemí a všem členům výzkumné skupiny, zvláště tedy Mgr. Davidu Profousovi, Mgr. Radoslavu Sokolovi a Mgr. Janě Pospíšilové, společně s mou kolegyní Michaelou Kolářovou, za jejich pomoc, ochotu a přátelský přístup. Dále děkuji také doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D., za provedenou korekturu a komentáře.

Poděkování patří také Laboratoři růstových regulátorů UPOL za biologické testování a to především doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi a Mgr. Radkovi Jordovi.

Dále děkuji svému řediteli PaedDr. Miroslavu Bialoňovi, mému třídnímu učiteli Mgr. Janu Josiekovi, a ostatním vyučujícím, za jejich pochopení a shovívavost při vysoké absenci, díky které jsem měl možnost dojíždět do olomouckých laboratoří. Zvláště tedy Mgr. Janě Čopíkové za její velkou ochotu při gramatické korektuře a Mgr. Janě Pastuchové, za skvělé organizační schopnosti a odborné rady v kontextu s touto soutěží.

V neposlední řadě děkuji také mé nejbližší rodině, Pavlu, Monice a Sofii Bojkové, a přátelům, Ondřeji Pawliczkovi a Lukáši Galmusovi, kteří mě podporovali a byli mi vždy mentální oporou. Velké poděkování si zaslouží má přítelkyně Barbora Dopitová a to za její cenné profesní rady a velkou mentální oporu při psaní této práce.



Katedra Organické Chemie

Univerzita Palackého v Olomouci

Anotace

Tato práce se věnuje přípravě trisubstituovaného purinového inhibitoru, který by měl působit jako duální inhibitor dvou enzymů a to cyklin-dependentní kinázy 4 a 6 a tyrosin-proteinkinázy receptorového typu FLT3. Tento purin je strukturně odvozený od komerčně dostupného CDK4 inhibitoru Palbociclibu a experimentálního duálního inhibitoru AMG 925. CDK4 inhibitory jsou látky účinné v léčbě rakoviny prsu. FLT3 inhibitory jsou látky účinné v léčbě akutní myeloidní leukémie. Ukázalo se, že u kombinované léčby s CDK4 inhibitory je progresse léčby vyšší díky nižšímu rozvoji rezistence u léčby akutní myeloidní leukémie. Teoretická část se zabývá mechanismem regulace buněčného cyklu pomocí CDK a zároveň popisuje významné syntetické metody, které v této práci byly použity pro syntézu cílové látky. Všechny syntetické kroky společně s popisem reakčního mechanismu jsou popsány v diskuzní části.

Klíčová slova

CDK inhibitory, AMG 925, Palbociclib, Buchwald-Hartwig reakce, FLT3 rezistence, nádorová terapie

Annotation

The present work is devoted to the preparation of a trisubstituted purine inhibitor that should act as a dual inhibitor of two enzymes, namely cyclin-dependent kinase 4 and 6 and the receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3. This purine is structurally derived from the commercially available CDK4 inhibitor Palbociclib and the experimental dual inhibitor AMG 925. CDK4 inhibitors are agents effective in the treatment of breast cancer. FLT3 inhibitors are agents effective in the treatment of acute myeloid leukaemia. Combination therapy with CDK4 inhibitors has resulted in higher treatment progression due to the lower development of resistance in acute myeloid leukaemia. The theoretical section discusses the mechanism of cell cycle regulation by CDKs and also describes the major synthetic methods used in this work to synthesize the target substance. All synthetic steps, together with the description of the reaction mechanism, are described in the discussion section.

Keywords

CDK inhibitors, AMG 925, Palbociclib, Buchwald-Hartwig coupling, FLT3 resistance, cancer therapy

SEZNAM ZKRATEK

(dppf) ₂	ligand 1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen
Ala (A)	alanin
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
ANCYT	anticytokininy
Arg	arginin
Asp (D)	aspartam
ATP	adenosintrifosfát
BDDC	<i>N,N'</i> -bis(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl-methyl)karbodiimid
BMC	<i>N-tert</i> -butyl- <i>N'</i> -methylkarbodiimid
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldikarbonát
Bpin	bis(pinakolato)dibor
BTK	Brutonova tyrosinkináza
BuOH	<i>n</i> -buthanol
CAK	CDK-aktivující kináza
CDK	cyklin-dependentní kináza
CDKi	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
CIP	CDK interakční protein
C _{MAX}	maximální dosažitelná hladina účinné látky v krevní plazmě
CPME	cyklopentyl methyl ether
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid

DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMI	1,3-dimethyl-2-imidazolidinon
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	plně deuterovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDCI	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ER+	pozitivní exprese estrogenového receptoru
ES-SCLC	malobuněčný karcinom plic v rozsáhlém stadiu
Et ₂ O	diethylether
Et ₃ N	trimethylamin
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)
FLT3	FMS-podobná tyrosinkináza III
FMS	tyrosin-proteinkináza III typu
G0	klidová fáze (buněčný cyklus)
G1	1. růstová fáze (buněčný cyklus)
G2	2. růstová fáze (buněčný cyklus)
Glu (E)	glutamin
Gly (G)	glycin
HDAC	histonové deacetylázy
HER2	pozitivní exprese lidského receptoru epidermálního růstového faktoru-2
HOBi	2-fenyl-1 <i>H</i> -benzimidazol-1-ol
HOBt	1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ol
HOObt	3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i>)-on

HPLC	vysokotlaká/vysokoúčinnostní kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností
HSC	hematopoetické kmenové buňky kostní dřeně
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
INK4	proteiny inhibující aktivitu CDK4
ITD	vnitřní duplikace juxtamembránové domény u FLT3
KIP	kinázový inhibiční protein
LC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním detektorem
M	mitóza (buněčný cyklus)
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MorOX	<i>N</i> -hydroxy-2-morpholino-2-oxoacetididoyl kyanid
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pd(dba) ₂	bis(dibenzylidenacetone)palladium(0)
Pd(OAc) ₂ dppf	(1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen)palladium(II) diacetát
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenylfosphin)palladium(0)
PDB	Protein Data Bank
PEC	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -fenylkarbodiimid
Phe (F)	fenylalanin
PKC	proteinkináza C
pRb	retinoblastomový protein
Pro (P)	prolin
RBL	protein podobný retinoblastomovému proteinu
rt	pokožová teplota
RVO	rotační vakuová odparka

S	syntetická fáze (buněčný cyklus)
Ser	serin
S _N ²	substituce nukleofilní – bimolekulární
SÚKL	státní ústav pro kontrolu léčiv (ČR)
TFA	trifluoroctová kyselina
TFAA	trifluoracetanhydrid (anhydrid kyseliny trifluoroctové)
TFG-β	transformující růstový faktor β
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonin
TMTHF	2,2,5,5-tetramethyltetrahydrofuran
UPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

OBSAH

1	Úvod a cíle práce	14
2	Teoretická část	16
2.1	Buněčný cyklus	16
2.2	Proteinové kinázy	17
2.2.1	Struktura proteinových kináz.....	18
2.3	Cyklin-dependentní kinázy	19
2.3.1	CDK 4/6.....	20
2.4	Chemické ATP kompetitivní inhibitory CDK	22
2.4.1	Přírodní inhibitory CDK.....	23
2.4.2	Syntetické inhibitory CDK	24
2.4.3	Duální inhibitory CDK	25
2.5	Buchwaldova-Hartwigova reakce	28
2.5.1	Mechanismus	28
2.5.2	Využitelné katalyzátory a ligandy	29
2.5.3	Využití	31
2.6	Karboxyl-aminová kondenzace.....	35
2.6.1	Mechanismus	36
2.6.2	Využitelná aditiva a karbodiimidy.....	37
2.6.3	Využití	39
3	Diskuse a výsledky	43
3.1	Design struktur cílových látek	43
3.1.1	Retrosyntetická analýza přípravy inhibitoru I	45
3.2	Syntéza cílových látek.....	47
3.2.1	Příprava aminu VIII	48
3.2.2	Příprava intermediátu IX	50
3.2.3	Příprava aminu II	52

3.2.4	Příprava intermediátu XIII pro syntézu aminu III	53
4	Experimentální část.....	55
4.1	Obecné informace o aplikované metodice	55
4.2	Příprava cílových látek.....	56
4.2.1	<i>tert</i> -Butyl 2-chloro-7,8-dihydro-1,6-naphthyridin-6(5 <i>H</i>)-karboxylát (XII).....	56
4.2.2	2-Chlor- <i>N</i> ⁴ -cykloheptylpyrimidin-4,5-diamin (V)	57
4.2.3	2-Chlor-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9 <i>H</i> -purin (VI).....	57
4.2.4	9-Cykloheptyl-2-hydrazinyl-8-(trifluoromethyl)-9 <i>H</i> -purin (VII)	58
4.2.5	2-Azido-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9 <i>H</i> -purin (XV).....	58
4.2.6	9-Cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9 <i>H</i> -purin-2-amin (VIII).....	59
4.2.7	<i>tert</i> -Butyl 2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9 <i>H</i> -purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5 <i>H</i>)-karboxylát (IX)	60
4.2.8	<i>N</i> -(9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9 <i>H</i> -purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amin (X)	61
4.2.9	<i>N</i> -(9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9 <i>H</i> -purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amonium chlorid (X-HCl).....	62
4.2.10	1-(2-((9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9 <i>H</i> -purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5 <i>H</i>)-yl)-2-hydroxyethan-1-on (I)	63
5	Inhibice proteinových kináz a cytotoxicita	64
6	Závěr	65
7	Bibliografický záznam	67
8	Přehled schémat, obrázků, tabulek a spekter	81
9	Přílohy – NMR spektra	91

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou makromolekulární proteinové komplexy, které sehrávají klíčovou roli v buněčných systémech. Jejich nezbytnost spočívá v regulaci jednotlivých fází buněčného cyklu, na jehož konci má buňka možnost dělení, díky kterému předává svou genetickou informaci. Selektivní inhibicí těchto jednotlivých proteinových komplexů se může docílit stagnace buňky. Zastavení buněčné proliferace v jedné či více fázích buněčného cyklu, což vede k oslábnutí nádorových buněk, které následkem toho mohou podlehnout apoptóze nebo jinému typu buněčné smrti. Kumulativní výsledek může znamenat částečnou či kompletní selektivní regresí zacílené buněčné skupiny.

Tato práce si klade za cíl připravit nové biologicky aktivní látky, jenž budou cíleně, specificky a reverzibilně inhibovat proteinový komplex CDK4/6. K tomuto účelu byl připraven duální inhibitor **I** jehož struktura byla navržena na základě biologicky aktivní látky **PCC14-NM-4E** (Obrázek 1), která byla připravena vedoucí mé práce Mgr. *et* Mgr Monikou Tomanovou ve výzkumné skupině doc. RNDr. Petra Cankaře, Ph.D. Látka PCC14-NM-4E, jejíž struktura byla odvozena ze struktury klinicky dostupného CDK4 inhibitoru Palbociclibu, již disponuje důležitými strukturními motivy, a to tedy konkrétně donory a akceptory vodíkových vazeb a hydrofobním substituentem, které jsou zodpovědné za interakce s aktivními místy CDK inhibitorů (Obrázek 1).^{1,2}

Cílová látka **I** se pak v porovnání s látkou PCC14-NM-4E liší substitucí v poloze 2 původního heterocyklického kruhu. Substituent, který je zde zaveden, je inspirován strukturním motivem látky AMG 925, jenž je duálním inhibitorem CDK4 kinázy a tyrosin-proteinkinázy receptorového typu FLT3. Tento substituent byl připravován z komerčně dostupných výchozích látek. Takto strukturovaná molekula má vykazovat selektivní inhibiční aktivitu vůči dvěma doménám proteinových kináz (duální inhibice) a to konkrétně vůči CDK4/6 doméně a FLT3 doméně.³

Teoretická část mé práce je zaměřena na popis regulace buněčného cyklu pomocí CDK kináz a také zde budou popsány významné syntetické metody, které v této práci byly použity.

V diskusní části se zaměřuji na vlastní ohodnocení jednotlivých syntetických kroků. Zajímavostí této práce je využití přímé redukce hydrazinové skupiny na amin, která je jen stroze

popsána v literatuře. Zároveň byla tato reakce použita na purinovém skeletu, což je substrát, který podle literatury nebyl nikdy testován v tomto typu reakce.

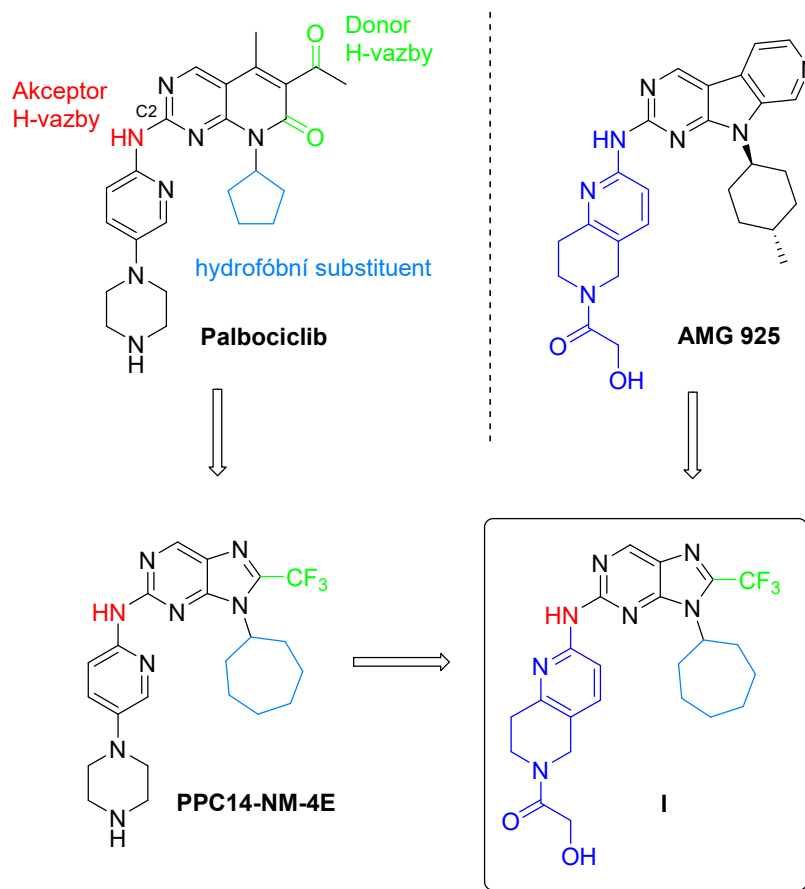


Schéma 1: Znárodnění myšlenkového postupu využitého při návrhu cílové látky I.^{2,4}

V experimentální části je popsán komplexní postup přípravy osmi látek včetně kompletní charakterizace pomocí standardních analytických metod. Konkrétně se jedná o stanovení přesné molekulové hmotnosti, teplotu tání a NMR. Šest z těchto osmi látek jsou nové struktury doposud nepopsané v literatuře.

Poslední část práce se věnuje ohodnocení biologické aktivity připravených látek na vybraných enzymech a buněčných liniích. Biologická aktivity byla testována na externím pracovišti v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci.

Tato práce je výsledkem dvouletého výzkumu, který byl prováděn mnou, jakožto autorem této práce na Katedře Organické Chemie Univerzity Palackého v Olomouci, a to konkrétně ve výzkumné skupině doc. RNDr. Petra Cankaře, Ph.D..

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčný cyklus

Pro savce a další řadu organismů různých kategorií je proliferace esenciálním životním faktorem. Tímto mechanismem dochází k duplikaci minoritní skupiny buněk, jako je například epitel a kostní dřev. Dochází při ní k rozdělení haploidní či diploidní matečné buňky, přičemž vznikají dvě nové dceřiné buňky, které jsou nositeli genetického materiálu mateřské buňky, který je s ní v ideálním případě totožný.⁵

Buněčný cyklus je rozdělen do několika fází a to G1 fáze, S fáze, G2 fáze a M fáze (Schéma 2). Po mitóze (M-fáze) je cyklus okamžitě zahájen G1 fází, ve které dochází k biosyntéze proteinů a dalších stavebních bloků potřebných pro duplikaci DNA, ke které dochází v S fázi. Následná G2 fáze připraví buňky k mitóze. Terminální M fáze zajistí homogenní distribuci genetického materiálu a finální rozdělení buňky. Takto rozdělené buňky jsou plně diferencované a připravené k vykonávání svých funkcí v rámci dané orgánové soustavy.

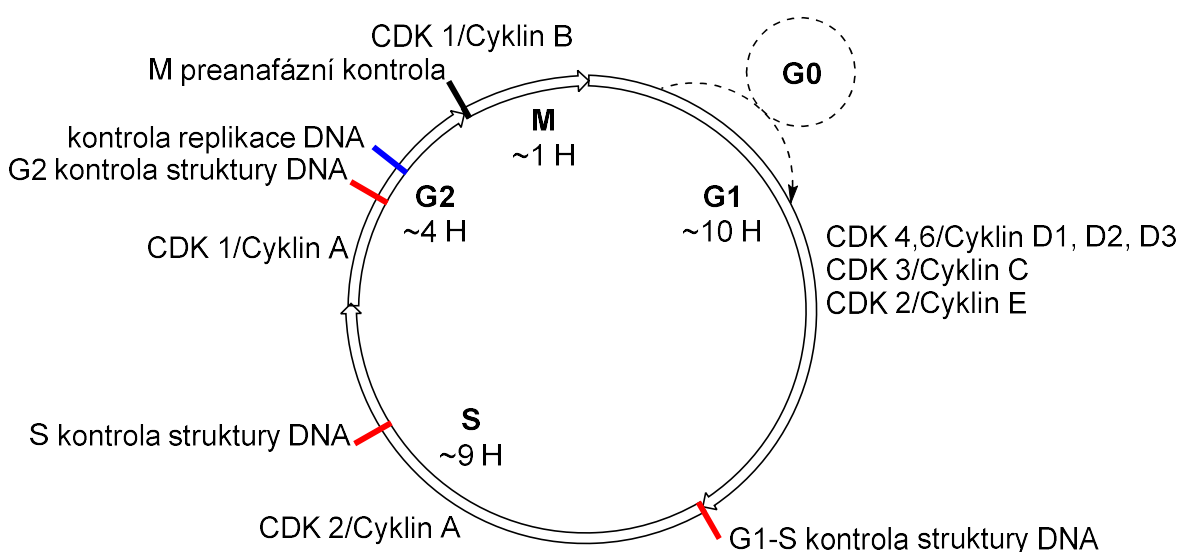


Schéma 2: Vliv CDK na regulaci buněčného cyklu.

V rámci buněčného cyklu dochází ke kontrole genetického materiálu, a to tedy konkrétně na počátku S fáze, kdy je kontrolována post mitotická DNA, a na počátku G2 fáze, kdy je kontrolována čerstvě syntetizovaná DNA vystupující z S fáze. Tyto kontrolní body slouží

k eliminaci inkorporace genetické chyby, která by se projevila v následující generaci buněk. V případě poškození je proliferace buňky zastavena.⁶

K zastavení proliferace slouží G0 fáze, ve které dochází k reparačním procesům, které umožní buňce zpětný návrat do G1 fáze. V případě neopravitelných chyb dochází k cytolýze, jež zbaví buňku schopnosti budoucí distribuce defektního genetického materiálu.⁷

Při disfunkci reparačních mechanismů v průběhu buněčného cyklu dochází k inkorporaci chybové DNA do budoucí filiální generace. K této chybě může dojít při snížené citlivosti regulačních faktorů na podněty signálních drah a růstových faktorů. Toto znečitlivění znemožní buňku uvést do degradačního stavu, což se v následujících filiálních generacích může projevit zvýšenou mitotickou aktivitou, která si nese za důsledek možný rychlejší průběh nádorového onemocnění v případě, nese-li daná buněčná linie mutantní onkogeny.^{8,9}

Kombinace těchto faktorů jsou následně zodpovědné za vznik nádorového onemocnění.

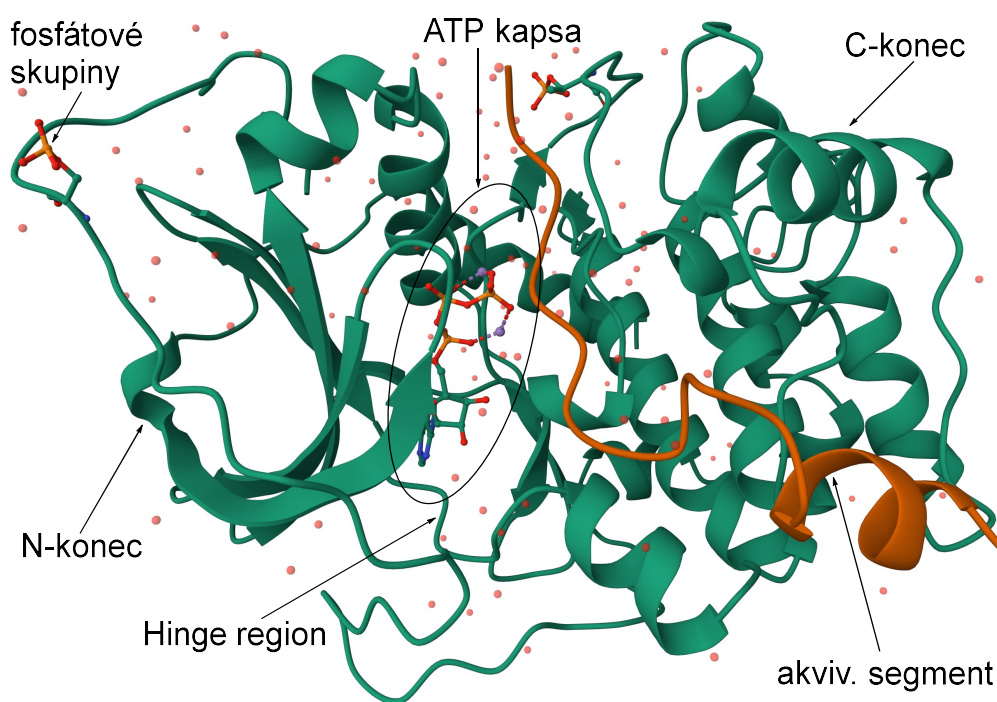
2.2 Proteinové kinázy

Proteinové kinázy jsou intracelulární enzymy, které katalyzují transport fosfátové skupiny adenosintrifosfátu (ATP) na jiné funkční proteiny a nižší peptidy. V eukaryotických buňkách jsou klíčem k regulaci většiny buněčných pochodů a signálních drah. Pomocí defosforylace proteinové kinázy a fosforylace navazující proteinové jednotky dochází vně i mimo buňku k přenášení informací. Fosforylace jako taková může vést k aktivaci či dezaktivaci různých enzymů, umožnit vznik vazby mezi dvěma proteiny, měnit konformaci proteinů či uskutečnit aktivaci imunitní odpovědi.¹⁰

Eukaryota disponují 518 různými proteinovými kinázami, přičemž 478 z nich se řadí mezi typické proteinové kinázy a 40 je řazeno mezi atypické. Typické kinázy jsou dále rozděleny na základě toho, jakou aminokyselinu proteinová kináza následně fosforyluje, a to tedy konkrétně na serin-threoninové (388) a tyrosinové (90). Atypické proteinové kinázy sice disponují biochemickou kinázovou aktivitou, ale zato postrádají sekvenční podobnost s ostatními eukaryotickými kinázami, proto o této skupině nebude dále pojednáváno.^{11,12}

2.2.1 Struktura proteinových kináz

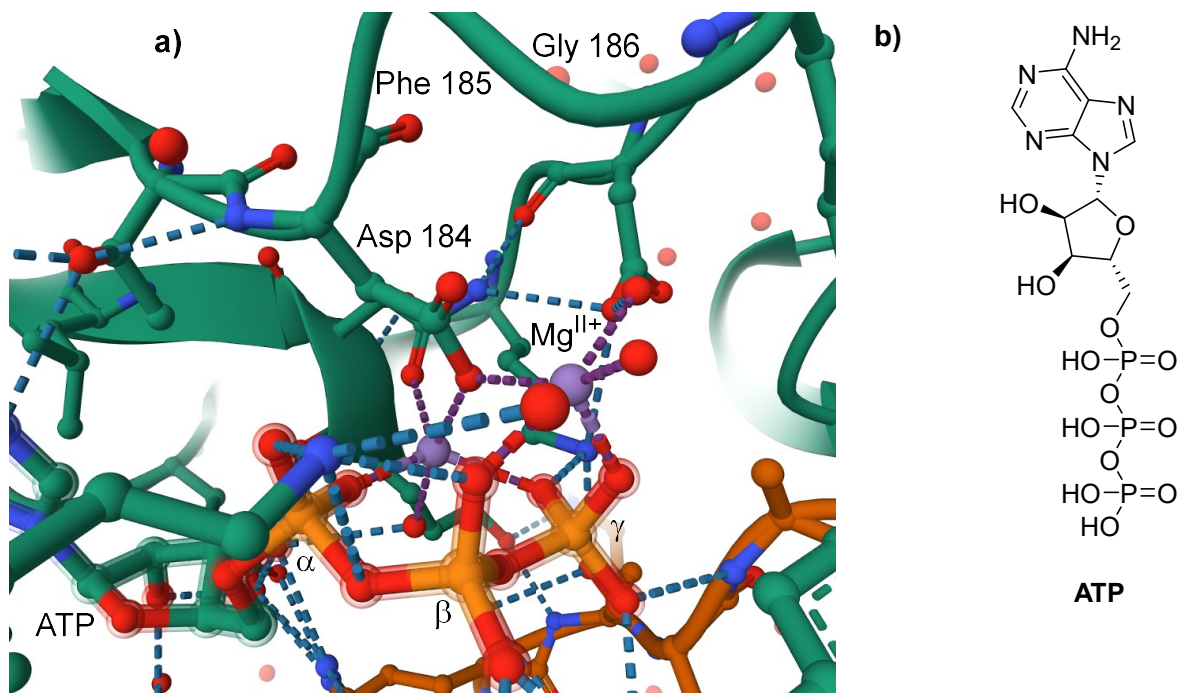
Veškeré typické proteinové kinázy disponují strukturální podobností, kterou lze popsat pomocí dvou domén – N a C koncem (Obrázek 2). Menší N-koncová doména je složena z β -skládaných listů a dlouhého α -helixu, přičemž objemnější C-koncová doména je převážně α -helikální. Tyto dvě části jsou vzájemně propojeny pomocí tzv. Hinge peptidu, díky kterému může N-konec vůči C-konci zaujmout širokou škálu konformačních pozic.¹³



Obrázek 1: Obecná struktura proteinové kinázy (PDB kód: 1ATP)¹⁴

Na samotném C-konci je umístěn aktivační segment, tedy úsek 25-30 aminokyselin situovaných mezi stericky nedostupným regionem Asp-Phe-Gly (DFG) a dostupnějším regionem Ala-Pro-Glu (APE). Na tomto aktivním segmentu v aktivní konformaci kinázy následně vzniká štěrbina, v níž DFG úsek zajišťuje koordinaci dvou iontů hořčíku Mg^{2+} , které následně umožňují správnou orientaci ATP vně kinázy, a to tedy konkrétně orientaci jejich fosfátových skupin (Obrázek 3).^{15,16}

Kináza se po procesu fosforylace sekundárního peptidu navrácí zpět do své inaktivní konformace, která vzniká buďto odpojením regulační podjednotky, nebo natočením DFG úseku čelem k ATP interakční kapse. V obou případech dochází ke konformační změně, která stericky brání v interakci s ATP.¹⁷



Obrázek 2: Detail vazebného místa pro ATP (PDB kód: 1ATP)¹⁴; (b) strukturní vzorec ATP.¹⁴

2.3 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou fosforylující holoenzymy, jejichž katalytická aktivita závisí na přítomnosti cyklinu, s nímž tvoří heterodimerní podjednotky, přičemž cyklin je pozitivní regulační podjednotkou, která CDK kináze pouze umožňuje vykonávat její katalytickou aktivitu. Ke kompletní aktivaci většiny kináz dochází až po fosforylaci threoninových částí (Thr160) na tzv. T-smyčce holoenzymu, ke které dochází působením CDK-aktivační kinázy 1 (CAK1). Význam CDK spočívá pak v integraci intercelulárních a intracelulárních signálů.^{18,19}

V plně vyvinutých lidských tkáních je většina buněk s diploidním obsahem DNA, po S fázi, zdržena v G₀ fázi a to buďto trvale (neurony), či dočasně (hepatocyty). Pomocí stimulace mitogenními faktory (hormony nebo růstové faktory) dochází ke zpětné inkorporaci těchto buněk do cyklického procesu. Tyto faktory aktivují kaskády intracelulárních signálních drah, které působí na CDK/cyklinové komplexy, které následně poskytnou hladký průběh mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu.²⁰⁻²²

Průlom v pochopení principu regulace buněčného cyklu pomocí CDK nastal po objevu genů *cdc2+* and *cdc28*, které u modelových organismů *Schizosaccharomyces pombe* a *Saccharomyces cerevisiae* zprostředkovávají translaci CDK, jejíž přítomnost je vyžadována u G1-S a G2-M přechodu. U těchto organismů jsou tyto přechody moderovány pouze jedinou CDK. Tento objev vedl k předpokladu přítomnosti vyššího počtu regulačních komplexů v komplikovanějším buněčném systému savců. Konkrétně v lidském těle pracuje 20 CDK kináz a 29 cyklinů, přičemž ne všechny se nutně podílejí na regulování buněčného cyklu.^{18,23–25}

CDK1-6 a CDK14-18 přímo regulují fáze buněčného cyklu a buněčného dělení, zatímco CDK7-13 a CDK20 zprostředkovávají genovou transkripci. Expresse jednotlivých CDK a korespondujících cyklinů pak periodicky kolísá v závislosti na fázi buněčného cyklu.²⁶

Tato práce se zabývá syntézou duálních inhibitorů komplexů CDK4 a CDK6 a jejich vlivu na G1-S přechod, proto bude následující pozornost zaměřena výhradně na tuto kinázovou skupinu.

2.3.1 CDK 4/6

Klíčovou reakcí na mnoho růstových faktorů v mnoha typech proliferujících buněk je aktivace CDK4 a CDK6 a to pomocí proteinů z rodiny cyklinů D (D1, D2, D3), které jsou esenciálními integrátory mitogenní signalizace, přičemž jejich zpětná deaktivace je řízena vazbou na proteiny z rodiny INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) a CIP/KIP rodiny (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}).

Proteiny rodiny INK4 inhibují pozitivní regulační aktivitu cyklinů typu D utvořením komplexů s CDK 4/6, přičemž nedochází k interakci s CDK1 a CDK2. V proliferujících buňkách dochází k expimaci těchto proteinů ve velmi nízkých, téměř nedetekovatelných hladinách. Indukce exprese je vyvolávána působením růstových regulátorů, např. rodinou cytokinů TGF-β.²⁷

Z INK4 rodiny hraje velmi významnou roli p16^{INK4A} protein, který je u člověka zodpovědný za potlačování indukce karcinogeneze. Rentgenová difrakční analýza komplexu p16^{INK4A}/CDK6 ukázala, že jeho regulační aktivita funguje na principu elektrostatické interakce mezi Asp84 na p16^{INK4A} a Arg31 na CDK6, což odpovídá Arg24 u CDK4. Z důvodů umístění těchto ligandově-aktivních aminokyselin blízko vazebného místa pro ATP je celková kinázová aktivita touto interakcí rapidně snížena. Kromě toho tato interakce snižuje povrch proteinu pro vazbu na pozitivní regulátor z rodiny cyklinů D. Tento fakt je podpořen zjištěním skutečnosti zvýšené aktivity CDK4 při její onkogenní mutaci genu zodpovědného za její translaci, a to tedy

konkrétně v místě lokace Arg24, což znemožňuje schopnost interakce s negativním regulátorem p16^{INK4A}. Kvůli této mutaci došlo k neúplnému navázání negativního regulátoru, což mělo za následek nestandardně zvýšenou proliferační aktivitu.²⁸⁻³¹

CIP/KIP rodina se váže na komplexy CDK2 /cyklin E, CDK2/cyklin A a CDK1/cyklin B, čímž je inaktivuje. Strukturální analýza p21^{CIP1} a p27^{KIP1} proteinů ukazuje, že jejich N-konec disponuje dvěma doménami, z nichž jedna je důležitá pro vazbu s cyklinovou podjednotkou a druhá pro asociaci s CDK. Takto koncipovaná struktura zajišťuje vysoce afinitní interakci s CDK a je ověřeno, že tyto dvě domény jsou jedním z hlavních specifit CIP/KIP rodiny.³²

Regulační aktivita je pro CIP/KIP proteinovou rodinu velmi specifická a selektivní. Tato skutečnost je například viditelná na specifické kinázové aktivitě proteinu p27^{KIP1}. Regulátor p27^{KIP1} vykazuje asociační aktivitu na komplex cyklinu D3 (CDK4/cyklin D3). Komplex CDK4/cyklin D3/p27^{KIP1} vykazuje kinázovou aktivitu, což ukazuje pouze na zvýšení strukturální stability, a tedy i katalytické aktivity CDK4/cyklin D3, nikoli jeho negativní regulaci.³²

Dosavadní studie naznačují, že asociace p21^{CIP1} a p27^{KIP1} na cyklin D (CDK4/cyklin D) způsobí selektivní redukci potenciálu vazby těchto regulátorů na cyklin E (CDK2/cyklin E), díky čemuž není omezena katalytická aktivita, což poskytne průběh z G1 do S fáze. V souvislosti s touto skutečností bylo zároveň prokázáno, že působení určitých růstových faktorů může způsobit jak u p21^{CIP1}, tak i u p27^{KIP1} negativní regulační aktivitu při asociaci na CDK4/cyklin D komplex.³²

Přechod mezi aktivační a inhibiční aktivitou p27^{KIP1} je způsoben exkluzivní fosforylací v polohách Tyr88 a Tyr89, které způsobí jeho konfirmační změnu, a tedy i změnu jeho vlastností. Zpětným působením tyrosin fosfatázy na difosforylovaný p27^{KIP1} způsobí navrácení jeho původních negativně regulačních vlastností. Díky schopnosti volné přizpůsobivosti aktivity p27^{KIP1} je možné provést akutní odpověď na růstové signály, což z tohoto konkrétního regulátoru činí významný molekulový přepínač.^{33,34}

Tato pozorování tedy ukazují, že regulace buněčného cyklu proteiny p21^{CIP1} a p27^{KIP1} vykazuje pozitivní i negativní regulační aktivitu, a to v závislosti na intercelulárních podmínkách.³⁵

Majoritní význam aktivovaných komplexů CDK4/6 spočívá ve střední, až pozdní G1 fázi, v níž zprostředkovávají fosforylaci retinoblastomového proteinu (pRb), který je významným nádorovým supresorem.

V buňkách, které se vyskytují v klidové fázi, je standardně pRb hypofosforylován. Interakcí této hypofosforylované formy s různými transkripčními aparáty je docíleno jejich dočasné deaktivace na přechodu G1-S fází, čímž je buněčný cyklus účelně brzděn. CDK 4/6 zapříčiní fosforylaci tohoto proteinu v polohách Ser780 a Ser795, což způsobí odpojení pRb od těchto vazebných partnerů. Kromě pRb existují ještě dva další proteiny p107 (RBL1) a p130 (RBL2), které vykazují velmi obdobnou biologickou aktivitu jako pRb, a které jsou rovněž fosforylovány CDK 4/6 komplexy.^{36,37}

Jedním z těchto vazebných partnerů je transkripční faktor E2F1, který způsobuje transkripci genů, jejichž translační produkty jsou nutné pro zahájení S fáze. Další z partnerů je histonová deacetyláza (HDAC), u níž byl pozorován komplex pRb/E2F1/HDAC, který se váže na promotory genů specifických pro S fázi, kde HDAC působí na okolní chromatin a způsobuje jeho uzavřenou konfirmaci. Fosforylace pRb, zprostředkovaná komplexem cyklinů D (CDK4/6 /cyklin D), umožňuje disociaci HDAC, ale také vede k uvolnění represorového proteinu, což následně způsobí expresi cyklinu E2, jehož komplex CDK2/cyklin E se následně váže do aktivního místa pRb. Hypoacetylovaný stav chromatinu za těchto podmínek není nadále udržován a acetylace histonů následně vede k otevření chromatinové struktury a aktivaci transkripce a následné translaci proteinů nutných pro průběh S fáze.^{38,39}

CDK 4 a CDK 6 jsou tedy významnými regulátory průběhu buněčného cyklu.

2.4 Chemické ATP kompetitivní inhibitory CDK

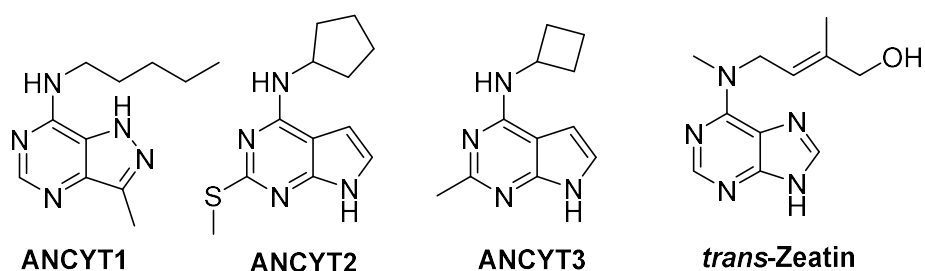
V moderní protinádorové terapii se za účelem inhibice cyklin-dependentních kináz využívá nepeptidických malých nízkomolekulárních látek, které mohou disponovat širokým spektrem mechanismů inhibiční aktivity. Nejčastějším a nejčilejším mechanismem inhibice CDK kinázy je ATP kompetitivita, při které daný chemický inhibitor vykazuje vyšší vazebnou aktivitu vůči vazebnému místu než ATP. Tímto mechanismem dochází k zabránění přenosu fosfátové skupiny, což má za důsledek zbrzdění či zastavení signální dráhy zprostředkované pomocí CDK.⁴⁰

Kumulativním výsledkem této aktivity je zpomalení buněčné proliferace.

2.4.1 Přírodní inhibitory CDK

Jedněmi z prvních inhibitorů cyklin-dependentních kináz byly prokázány přírodní izoláty z rodiny anticytokininů, které jsou významnými rostlinnými hormony regulujícími fyziologické pochody a diferenciaci buněk v průběhu růstu a života rostlinných organismů. Zástupcem rodiny anticytokininů je například anticytokinin 1 (ANCYT1), který při biologickém testování vykázal vysokou selektivní aktivitu vůči CDK1/cyklin B ($IC_{50} = 10,5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a CDK2/cyklinE ($IC_{50} = 5,2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Působením dvou dalších látek stejné třídy (ANCYT1, ANCYT2) však nebylo docíleno vysoké inhibiční aktivity, nicméně informace o závislosti struktury na aktivitě a selektivitě byla, na počátku studie využití nízkomolekulárních látek jakožto inhibitorů CDK, i přesto velmi cenná. Cytokinin *trans*-Zeatin izolovaný z nezralých zrn kukuřice seté (*Zea mays*) hraje významnou roli jako růstový regulátor. Jeho exprese indukuje mitózu, čímž se stimuluje růst postranních pupenů. Tato látka jako taková ale neprokázala téměř žádnou biologickou aktivitu vůči lidské CDK proteinové rodině.^{41–43}

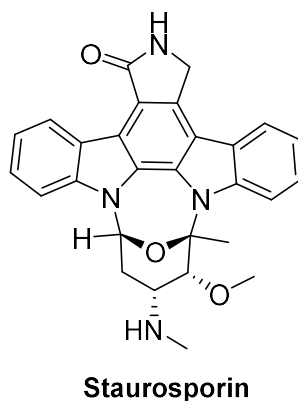
Použitím ANCYT1 byly v průběhu M fáze pozorovány abnormální morfologické změny, které zahrnovaly absenci anafázního rozchodu, nefunkční uspořádání mikrotubulů dělicího vřeténka okolo plně integrovaného jádra, které i přes viditelnou přítomnost pozdní M fáze stále disponovalo jeho jaderným obalem, a dalších defektních změn, jejichž přítomnost je neslučitelná se správným průběhem M fáze. Takto abnormálně defektní buňky byly degradačními mechanismy uvedeny do stavu apoptózy.⁴¹



Obrázek 3: Přírodní anticytokininy (ANCYT1-3) a cytokinin *trans*-Zeatin.

Další ze zajímavých přírodních izolátů, vykazující relativně vysokou biologickou aktivitu, je Staurosporin. Tato látka byla izolována roku 1977 z bakterie *Streptomyces staurosporeus*, které jí slouží jako kompetitivní antibiotikum zajišťující dominanci v daném prostředí. Přestože vykazuje zajímavou biologickou aktivitu vůči CDK1 ($IC_{50} = 0,003 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a CDK7

($IC_{50} = 0,007 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), tak do klinické praxe nikdy nedospěla, a to z důvodu nízké selektivity, která se projevila na ovlivnění vysokého počtu necílených proteinových kináz. Působení takto aktivní látky v organismu by bylo spřaženo s významnou mírou vedlejších účinků, které by byly pro hypotetickou léčbu nebenefitní.⁴⁴⁻⁴⁶



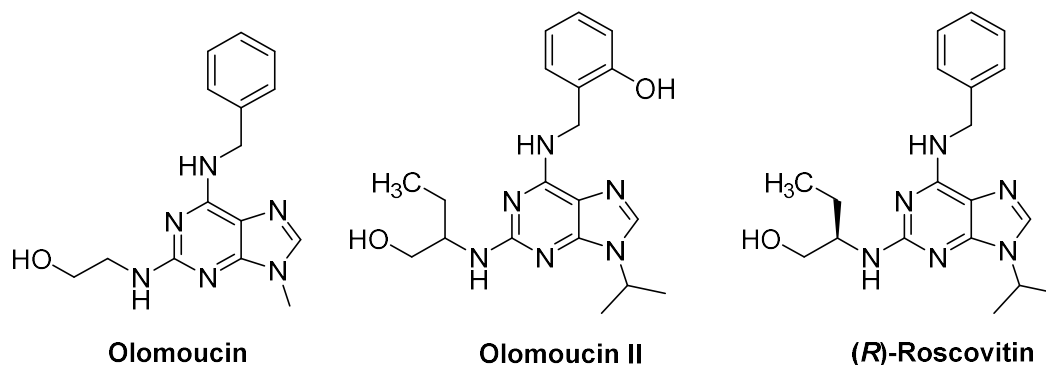
Obrázek 4: Přírodní izolát – Staurosporin.

2.4.2 Syntetické inhibitory CDK

Po obdržení základních poznatků o biologické aktivitě přírodních izolátů byla vyšší pozornost věnována syntéze strukturálně jednodušších a selektivnějších inhibitorů CDK.

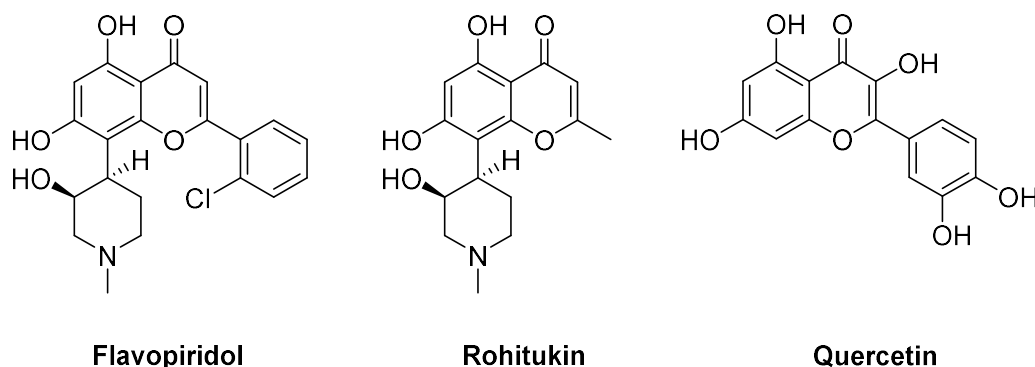
Studiem přírodních purinových izolátů z rodiny anticytokinů (viz. Obrázek 4) byla obdržena informace o závislosti struktury na aktivitě a selektivě vůči CDK. Na základě těchto předešlých studií byl vytvořen farmakofor, jímž se stal 2,6,9-trisubstituovaný purin. Záměnou substituentů mohla být vytvořena první komplexní knihovna strukturálně příbuzných látek.

Jednou z prvních takto syntetizovaných látek se stal Olomoucín, který disponuje selektivní mikromolární inhibiční aktivitou vůči CDK1, CDK2 a CDK5. Konkrétně pro CDK1/cyklin B ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) vykazuje Olomoucín nejvyšší inhibiční aktivitu a selektivitu. Postupně byly výše uvedenou metodou syntetizovány další CDK1/cyklin B inhibitory, jako například Roscovitin ($IC_{50} = 0,45 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a Olomoucín II ($IC_{50} = 0,02 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), který se díky velmi zajímavé biologické aktivitě stal nejpotentnějším purinovým inhibitorem CDK kináz.⁴⁷



Obrázek 5: První syntetické inhibitory CDK – Olomoucine 1,2 a (R)-Roscovitine.

Velmi významným nepurinovým CDKi je Flavopiridol, který se stal prvním klinicky testovaným CDK inhibitorem, a to konkrétně proti akutní myeloidní leukémii (AML). Tato látka je analogem přírodních alkaloidů Rohitukinu, vykazujícího aktivitu vůči CDK9/cyklin T1 ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), a Quercetinu aktivního vůči CDK6 ($IC_{50} = 5,89 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), které byly nalezeny v indických stromech *Disoxylum binectariferum* a *Aphanamixis polystachya*. Flavopiridol nejvýrazněji blokuje CDK1/cyklin B ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), ale jeho aktivita byla potvrzena i na CDK 2 a CDK 4.⁴⁸⁻⁵³



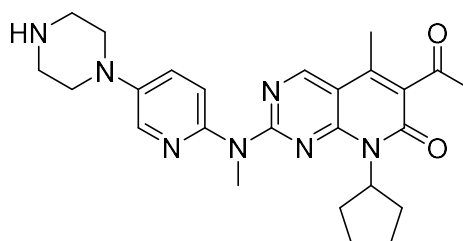
Obrázek 6: Flavonidové inhibitory CDK – Flavopiridol, Rohitukin a Quercetin.

2.4.3 Duální inhibitory CDK

V dnešní době je výzkum nových nízkomolekulárních nepeptidických inhibitorů cyklin dependentních proteinových kináz obecně cílen na selektivní multiaktivitu vůči dvěma a více biologickým cílům. Příkladem takové multiaktivní inhibice je CDK 4/6 inhibice, při níž dochází k selektivní duální blokaci signálních drah zprostředkované těmito dvěma kinázami, což vede k G1-S arresu.⁵⁴

Prvním FDA schváleným inhibitorem CDK se stal Palbociclib, který vykazuje právě vysoce specifickou duální aktivitu vůči CDK4/cyklin D1 ($IC_{50} = 0,011 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a CDK6/cyklin D2

($IC_{50} = 0,015 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), a současně nevykazuje při daných prahových koncentracích žádnou aktivitu vůči 36 strukturálně příbuzným proteinovým kinázám stejné rodiny (CDK). Je tedy vysoce selektivní. Po přijmutí 125 mg perorální cestou činí akutní biologická dostupnost přibližně 46 %, přičemž maximální koncentrační hladiny (C_{MAX}) je dosaženo po 6-12 hodinách od podání. Na lidské plazmatické proteiny je vázán z 85 %, přičemž stabilní plazmatické hladiny je dosaženo každodenním užíváním po dobu 8 dní. Biologická aktivita Palbociclibu závisí na expresi pRb, díky čemuž bylo v řadě klinických studií testována potence vůči různým nádorovým typům související s nadměrnou expresí pRb. Tento CDKi se využívá u léčby postmenopauzálních žen s pokročile metastazujícím karcinomem prsu typu ER+/HER2. U tohoto typu rakoviny prsu dochází ke zvýšené expresi receptoru lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2), který je pozitivním regulátorem CDK4/6. Společně s tímto dochází ke zvýšené expresi estrogenového receptoru (ER+), který rovněž podporuje proliferační aktivitu. Po významné klinické studii PALOMA-1/TRIO-18, byl tento lék pod značkou Ibrance – Pfizer, schválen americkou FDA ve zrychleném schvalovacím procesu v únoru 2015 k léčbě metastazujícího ER+/HER2 karcinomu prsu, přičemž v listopadu téhož roku byl schválen i komisí SÚKL i v ČR.^{1,55–58}



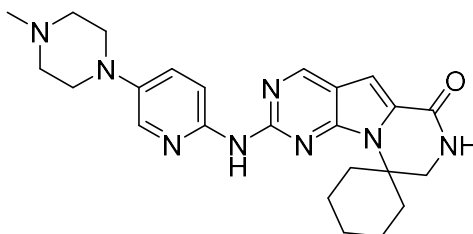
Palbociclib

Obrázek 7: Duální inhibitory CDK – Palbociclib.

Další zajímavou látkou je Trilaciclib, což je selektivní CDK4/cyclin D1 ($IC_{50} = 0,001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a CDK6/cyclin D3 ($IC_{50} = 0,004 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) CDKi. Trilaciclib (COSELA – G1 Therapeutics) je v USA v klinické praxi používán ve formě infusního roztoku, přičemž jedna dávka odpovídá $240 \text{ mg}/\text{m}^2$ tělesné plochy. Tato terapie je využívána k snížení myelosuprese, ke které dochází používáním chemoterapeutik při primární léčbě metastazujícího malobuněčného karcinomu plic v rozsáhlém stádiu (ES-SCLC). Dostupná chemoterapeutika, běžně používána v klinické praxi k léčbě ES-SCLC, jsou málo selektivní (Etoposid) a kromě defektních tumor-induktivních blastocytů poškozují i ostatní zdravé buňky a tkáň, které přirozeně vykazují vysokou míru proliferační aktivity (vlasové folikuly, sliznice,

kostní dřeň). Nejvýznamnějším problémem je fatální myelosuprese hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně (HSC), při níž dochází k akutní anémii, neutropenii nebo trombocytopenii. Pokles těchto významných složek krevního obrazu může vést od vážné komplikace až k život ohrožujícímu stavu. Z tohoto důvodu je v USA běžně používán Trilaciclib jakožto první léčivo v myeloprezervační léčbě při ES-SCLS. Jeho aktivita vůči CDK4/6 vede k dočasnému zastavení buněčného cyklu u HSC a lymfocytů G1. Tímto mechanismem je docíleno jejich ochrany v době, kdy jsou nádorové buňky vystavovány neselektivnímu cytotoxickému chemoterapeutiku. Trilaciclib se používá exkluzivně při myeloprezervační léčbě ES-SCLC, jelikož replikace buněk u tohoto typu není řízena CDK4/6, a to v důsledku ztráty exprese retinoblastomového proteinu (pRb). Trilaciclib tímto zvyšuje odolnost vůči poškození vyvolanému chemoterapií a příznivě mění imunitní mikroprostředí.^{59–}

63

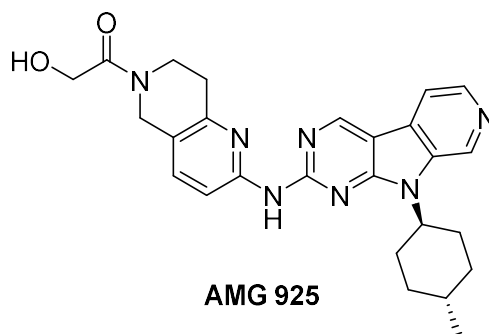


Trilaciclib

Obrázek 8: Duální inhibitory CDK – Trilaciclib.

Poslední látkou, které bude v této kapitole věnována zvýšená pozornost, je experimentální duální inhibitor AMG 925, který momentálně podléhá klinickým studiím. Tato látka vykazuje selektivní aktivitu napříč lidským kinomem, jelikož inhibuje CDK4 ($IC_{50} = 0,003 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$); CDK 6 ($IC_{50} = 0,008 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a FLT3 ($IC_{50} = 0,002 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). AMG 925 bylo navrženo pro selektivní inhibici FMS-podobné tyrosinkinázy 3 (FLT3), patřící do rodiny receptorových tyrosinkináz třídy III. Právě FLT3 je ve vysokých hladinách exprimována u pacientů trpících akutní myeloidní leukémií (AML) a akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). U 30 % pacientů byla nalezena vnitřní duplikace juxtamembránové domény (ITD), která způsobuje disregulaci buněčného cyklu. Při testování látek, které poskytly vysokou míru selektivity a aktivity vůči FLT3 (Sorafenib AC220), se narazilo na problém vzniku sekundární mutace genomu buněk ALL a AML, což vedlo ke konfirmační změně FLT3, čímž se eliminovala schopnost interakce inhibitoru s proteinem. Tento jev je způsoben velmi vysokou desregulovanou mitotickou aktivitou těchto blastických buněk. Zvýšená exprese byla u této skupiny buněk zaznamenána i v případě CDK4/6 s partnerskými cykliny D2 a D3. Působením duálního inhibitoru AMG 925

bylo docíleno podpoření apoetické aktivity, což vedlo ke snížení počtu proliferujících buněk v kolonii, díky čemuž došlo i k automatické eliminaci možné exprese mutantní FLT3-ITD. Věří se, že AMG 925 poskytne šetrnější alternativu vyúsťující v pozitivní prognózy u tohoto komplikovaného onemocnění.^{3,64,65}



Obrázek 9: Duální inhibitory CDK – AMG 925.

2.5 Buchwaldova-Hartwigova reakce

Buchwaldova-Hartwigova reakce je název pro palladiem katalyzovanou couplingovou reakci, při níž vzniká nová C–N vazba. Využívají se zde elektrofilní arylhalogenidy, které disponují sp^2 hybridizací uhlíku, jenž za přítomnosti katalytického množství palladia a báze reagují obecně s nukleofilními činidly, v případě Buchwald-Hartwigova couplingu pak nejčastěji nesaturovanými aminy či arylaminy.^{66,67}

V případě elektrofilních činidel pak lze mimo arylhalogenidů využít i tzv. pseudohalogenidů, aryl tosylátů či aryl triflátů. Jako palladiový zdroj se využívá celé řady palladnatých solí (prekatalyzátory) v oxidačním stavu (II) jež jsou pak *in situ* transformovány na vlastní katalyzátory (Pd^0) pomocí ligandů. Tyto ligandy jsou klíčovými prvky při těchto reakcích, neboť určují vlastní reaktivitu generovaných katalyzátorů.⁶⁸⁻⁷⁰

2.5.1 Mechanismus

Mechanismus Buchwald-Hartwigovy reakce se skládá, obdobně jako většina palladiem katalyzovaných reakcí, ze tří základních kroků: oxidativní adice, transmetalace, a redukční eliminace (Schéma 3). Nejprve je z použitého prekatalyzátoru generován katalyzátor (Pd^0), který vstoupí do katalytického cyklu prostřednictvím oxidativní adice s aryl (pseudo)halogenem. Ve druhém kroku je pak tvořen $Pd^{(II)}$ -aryl amid, jenž může být generován

bud' přímým vytěsněním (pseudo)halogenidu aminem, anebo formálně shodným vytěsněním, které probíhá ve dvou krocích přes Pd^(II)-alkoxidový meziprodukt. Nakonec Pd^(II)-aryl amid podlehne reaktivní eliminaci, jež vytvoří kýženou C-N vazbu a regeneruje Pd⁽⁰⁾ katalyzátor.⁷¹

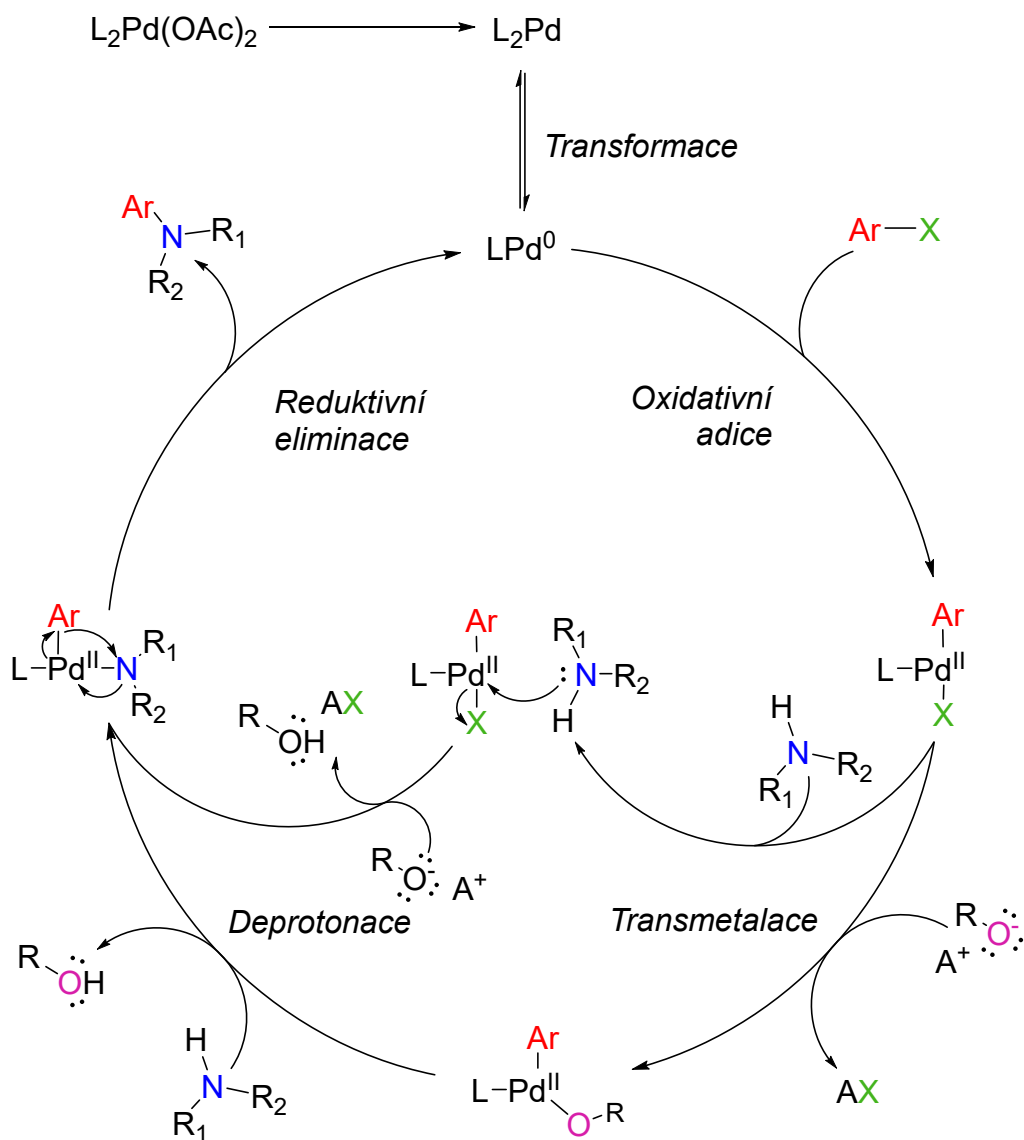


Schéma 3: Obecný mechanismus Buchwald-Hartwigovy aminace.

2.5.2 Využitelné katalyzátory a ligandy

Nezbytností všech cross-couplingových reakcí je použití katalyzátoru a ligandu, přestože jsou známy i optimalizace, které použití ligandu nevyžadují. Aktivním katalyzátorem je vždy Pd⁰, což znamená, že pokud je do reakčního systému vložen zdroj palladia ve formě palladnaté soli,

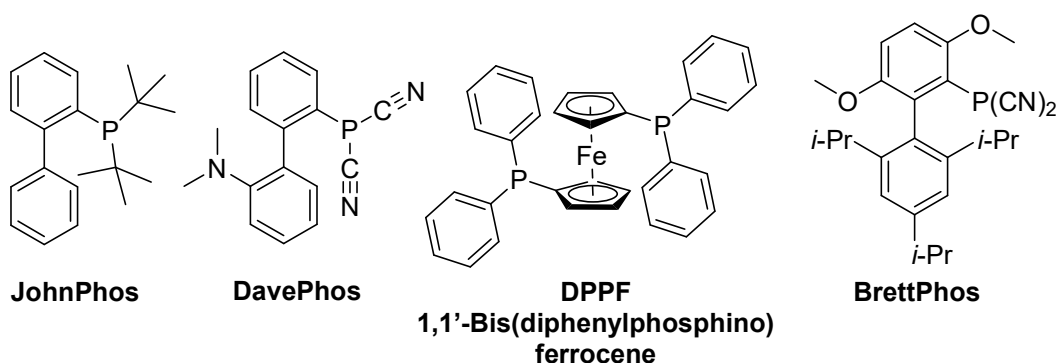
kteřá disponuje Pd^{II} (octan palladnatý, chlorid palladnatý, dusičnan palladnatý,...), pak musí dojít k *in situ* redukci na Pd^0 .

Ligandy v průběhu reakce dorovnávají změny elektronové hustoty, čímž komplex v průběhu reakce stabilizují a zabraňují tak jeho rozpadu před terminální spontánní reductivní eliminací. Reaktivita poté závisí jednak na stabilitě aktivního komplexu Pd^0 , jednak na ochotě komplexu podlehnout oxidativní adici a reductivní eliminaci.⁷²

Stabilita komplexu také závisí na afinitě ligandu k palladiu jako takovému. Pokud v průběhu reakce dojde k vyvázání palladia, pak tyto volné částice mohou tvořit kompaktní agregáty, jež nejsou schopny budoucí komplexace, což má negativní efekt na průběh a výtěžek syntézy. Tomuto efektu lze předejít stérickými bariérami ligandu, jež geometricky brání této agregaci.^{73,74}

Buchwaldovy ligandy 1. a 2. generace (RuPhos Pd G1, JohnPhos, aj.), vykazovaly při koordinaci na palladium nižší stabilitu, reakce musely probíhat za vyšších teplot, což mohlo mít negativní vliv na nezúčastněné substituenty substrátu. Běžně docházelo pouze k dehalogenaci arylhalogenidu, přičemž arylamin zůstal v systému nezměněn.⁷⁵

S dalšími poznatky byly postupně vyvinuty modernější dialkylbiarylfosfinové ligandy, které poskytují stabilnější koordinaci na palladium a umožňují reakčním systémům průběh za nižších teplot, než tomu doposud bylo.⁷⁶⁻⁷⁸



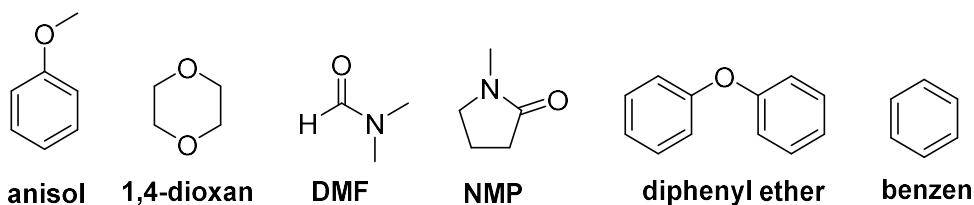
Obrázek 10: Příklady Buchwaldových ligandů.

2.5.3 Využití

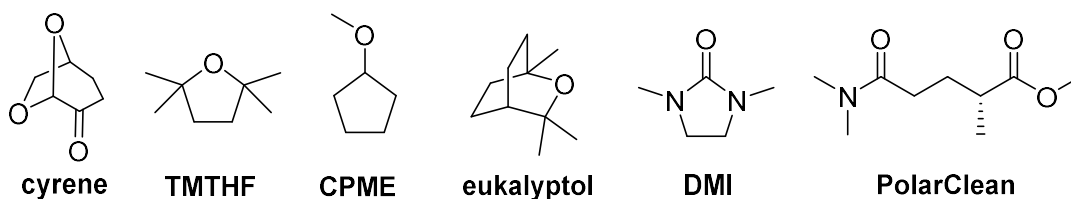
V historii se k formování C–N vazeb používalo běžných nukleofilních substitucí, které ale nebyly zdaleka tak efektivní, a to kvůli nutnosti použití velmi vysokých teplot, což vyžadovalo použití vysoce vřoucích rozpouštědel, která jsou ale ve většině případů velmi toxická (*N,N*-dimethylformamid, *N*-methylpyrrolidon, difenylether, atd.). S příchodem Ullmanovy-Goldbergovy kondenzace změna nenastala, jelikož reakční systém trpěl na nutnost použití extrémně vysokých dávek kovového katalyzátoru či pevné slitiny (např. Cu×CuO). Reakce však vyžadují velmi dlouhé reakční časy a poskytují produkty o nízké čistotě a výtěžku. I přes tento fakt je nutno Ullmanovu-Goldbergovu kondenzaci pozdvihnout, jelikož se jednalo o velmi pokrokovou reakci 20. století.^{79–81}

Palladiové katalyzátory v případě Buchwalda-Hartwiga poskytly produkty za kratší reakční čas při nižších teplotách, díky čemuž je možno využít éterických rozpouštědel, která jsou méně toxická (cyrene, 2,2,5,5-tetramethyltetrahydrofuran, eukalyptol, cyklopentyl methyl ether a další).^{82–86}

Starší solventy



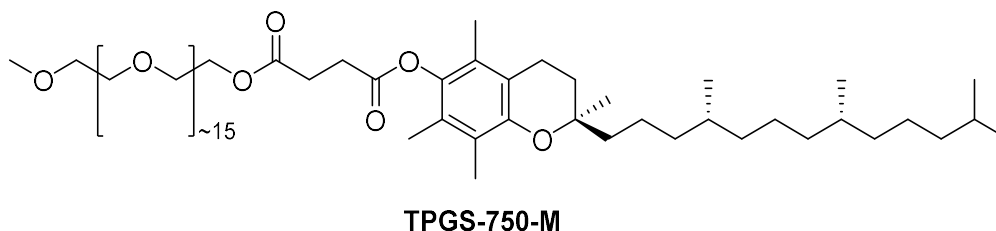
Šetrné moderní solventy



Obrázek 11: Aprotická rozpouštědla použitelná při couplingových reakcích rozdělena dle šetrnosti k životnímu prostředí.

V dnešní době již existují metody, díky kterým je možno palladiem katalyzované cross-couplingové reakce, včetně Buchwaldovy-Hartwigovy aminace, provádět ve vodném prostředí, a to za použití lipidům příbuzných surfaktantů (např: komerčně dostupný TPGS-750-M). Tyto lipidům příbuzné polymery poskytnou vznik micel, v nichž následně

reakce probíhá bez přítomnosti vody, která by reagenty včetně katalytických komplexů palladia degradovala. Voda v tomto případě slouží pouze jako distributor energie nutné pro průběh reakce. Tyto postupy se kvůli nutnosti strukturálně specifických reagentů ve vysokokapacitních syntézách nepoužívají.^{87,88}



Obrázek 12: Surfaktant TPGS-750-M.

Výhoda nejen této couplingové reakce spočívá v možnosti spojování komplexnějších intermediátů ve větší molekuly a usnadňuje tak syntézu složitějších molekul, které by bylo jinak obtížnější připravit. Buchwaldova-Hartwigova reakce je nyní využívána již přes 28 let, a to jak v medicíně, tak i při přípravě agrochemikálií a dalších průmyslově významných produktů.^[20]

Zajímavým příkladem je regioselektivní Buchwald-Hartwigova aminace, při které dochází ke vzniku C–N vazby mezi heteroaryl halogenidem a interním amidem. Tato reakce je klíčovým krokem v syntéze nového experimentálního reversibilního inhibitoru (GDC-0853) Brutonovy tyrosinové kinasy (BTK), jež moderuje vývoj B lymfocytů, které hrají významnou roli v progresi lymfoproliferativních poruch (Schéma 4). Již zmíněný klíčový krok je konkrétně reakce 2,4-dichloronicotinaldehydu **2** a tricyklického laktamu **1**, čímž vzniká tetracyklický chlorid **3**, jenž je podroben Suzuki-Miyaura couplingu s Bpin esterem **4**, čímž je obdržen oktacyklický intermediát **5**, jehož aldehyd je pomocí standardní redukce s využitím tetrahydroboritanu sodného redukován na finální látku. GDC-0853 momentálně podléhá klinickému testování. Tyto finální kroky jsou zajímavým příkladem toho, jak lze obdržet komplexní, téměř makromolekulární látky pomocí tandemových couplingových reakcí.^{89,90}

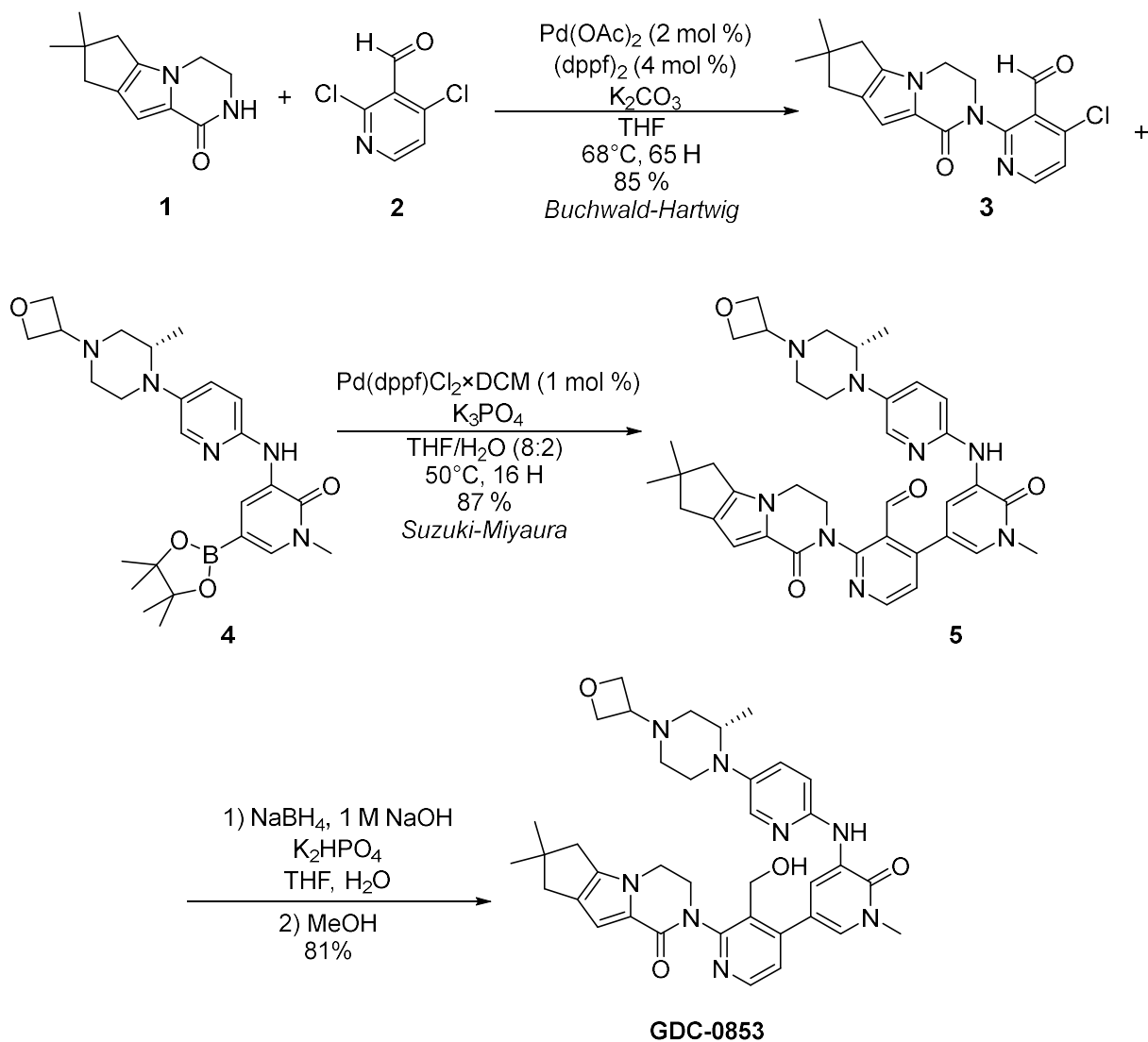


Schéma 4: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze BTK inhibitoru GDC-0853.⁹⁰

Jako příklad ze syntézy nízkomolekulárních látek lze uvést totální syntézu indolaktamu V, který je aktivátorem různých izoenzymů proteinkinázy C (PKC), která je významná pro téměř všechny buněčné pochody napříč buněčnými systémy. V tomto konkrétním případě indolaktam V dokáže moderovat vývoj buněk pankreatického typu. Pro vytvoření intramolekulární C–N vazby při syntéze intermediátu 7 byla zvolena Buchwaldova-Hartwigova makrocyclizace aminohalogenidu 6. Následnou methylací vzniklého sekundárního aminu a ochránění protektivní skupiny byl v následujících krocích obdržen finální produkt (Schéma 5).⁹¹

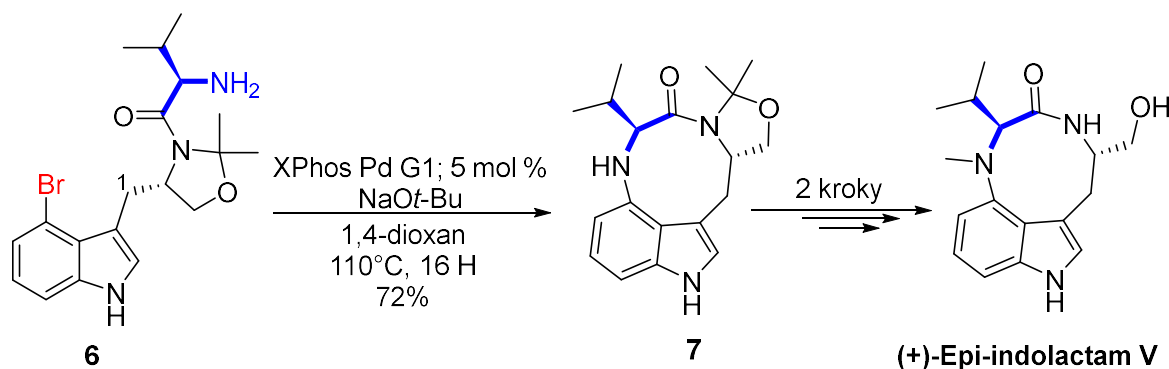


Schéma 5: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze Indolaktamu V.

Z oblasti agrochemikálií je této reakce využito například u přípravy fungicidu Mepanipyrimu, což je zajímavým důkazem toho, že alkyne jsou schopny setrvat za poměrně obtížných podmínek, které tuto reakci provázejí. Mepanipyrim je širokospektrálním anilinyrimidinovým fungicidem se zvýšenou účinností proti *Botrytis cinerea*, jež postihuje přednostně vinnou révu či jahody. Při syntéze Mepanipyrimu je využito hned několik palladiem katalyzovaných couplingových reakcí. Reakcí aryl iodidu **8** s methylzink bromidem je nejprve provedena regioselektivní Negishiho couplingová reakce, čímž je obdržen aryl bromid **9**. Ten je následně podroben chemoselektivní Sonogashirově reakci s propynem za vzniku aryl-alkyn chloridu **10**, jež následně reaguje s anilínem za podmínek Buchwaldovy-Hartwigovy reakce na výsledný Meapaniprym.^{92,93}

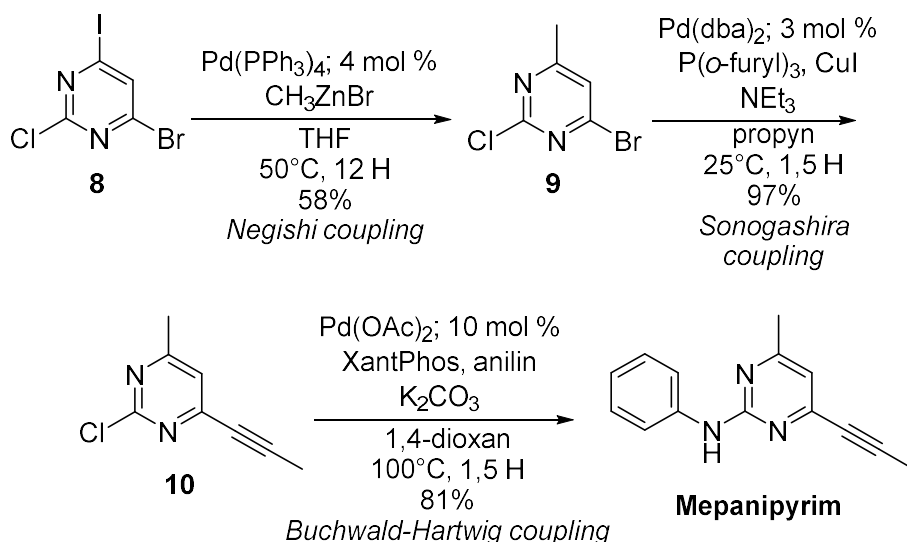


Schéma 6: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze fungicidu Mepanipyrimu.

2.6 Karboxyl-aminová kondenzace

Karboxyl-aminová kondenzace, pojmenovaná podle funkčních skupin reagujících substrátů, je couplingová reakce, při níž dochází k formě amidické vazby.^{94,95}

Amidická vazba zastává esenciální roli při syntéze peptidických řetězců, syntéze léčiv i agrochemických preparátů. Amid jako takový je významným strukturním motivem například v medicíně, jelikož disponuje vlastností být donorem (amin) i akceptorem (karbonyl) vodíkového můstku.⁹⁶

Při biosyntéze amidů, v tvorbě polypeptidů, dopomáhá vzniku vazby řada enzymů, které nejprve konvertují karboxyl aminokyseliny na aktivovaný ester, který až následně podléhá aminolýze za vzniku výsledného amidu. Tento proces je v jistých ohledech totožný s tím, který je používán industriálně při přímé přeměně karboxylové kyseliny na korespondující amid.⁹⁷

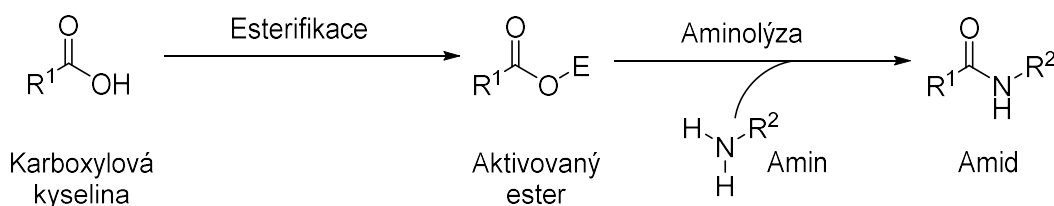


Schéma 7: Obecné schéma syntézy amidu.

Starší postupy syntézy amidů nevyžadují nutně tvorbu aktivovaného esteru, jelikož jsou zde využívány funkční aktivované deriváty karboxylových kyselin (acyl-halogenidy). Pomocí Schotten-Baumanovy kondenzace, do níž vstupuje karboxylová kyselina ve formě acyl chloridu, je výsledný amid obdržet prostým adičně-eliminacním mechanismem. Acyl chlorid lze obdržet konvenčně chlorací, například pomocí thionyl chloridu $SOCl_2$, oxalyl chloridu $(COCl)_2$, chloridu fosforitého PCl_3 , trifosforylchloridu $POCl_3$ a chloridu fosforečného PCl_5 . Při chloracích *in situ* se uvolňuje HCl , který může mít negativní vliv na citlivé substituenty substrátu. Přímá reakce karboxylové kyseliny s aminem za relativně vysokých teplot (okolo 150-200 °C) se využívá i dnes velmi hojně u vysokokapacitních průmyslových syntéz, přičemž hlavní nevýhodou je požadavek použití jednoduchých substrátů, které nepodlehnou v průběhu syntézy termické degradaci.⁹⁸⁻¹⁰¹

Moderní přístup syntézy nízkomolekulárních amidů v medicíně i polypeptidů na pevné fázi, využívá tvorby aktivovaného esteru, jehož vznik je indukován karbodiimidem, který v této práci byl využit, proto bude následující pozornost zaměřena výhradně na ně.

2.6.1 Mechanismus

Mechanismus tvorby amidu z karboxylových kyselin a aminů pomocí tvorby reaktivních esterů, který bych použit v této práci je obecně znázorněn ve schématu 8. Reakce je zahájena nukleofilní adicí deprotonované karboxylové kyseliny na uhlík *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu (DIC), čímž vznikne *O*-acylisomočovina **11**. Tento vysoce reaktivní klíčový intermediát je následně nukleofilně atakován reakčním aditivem s názvem OxymaPure. Po tomto kroku dojde k hydrolyze diisopropylmočoviny **12** a vzniká aktivní ester **13**. Ve finálním kroku reakce dochází k nukleofilní aminolýze aktivního esteru na výsledný amid **14**.¹⁰²

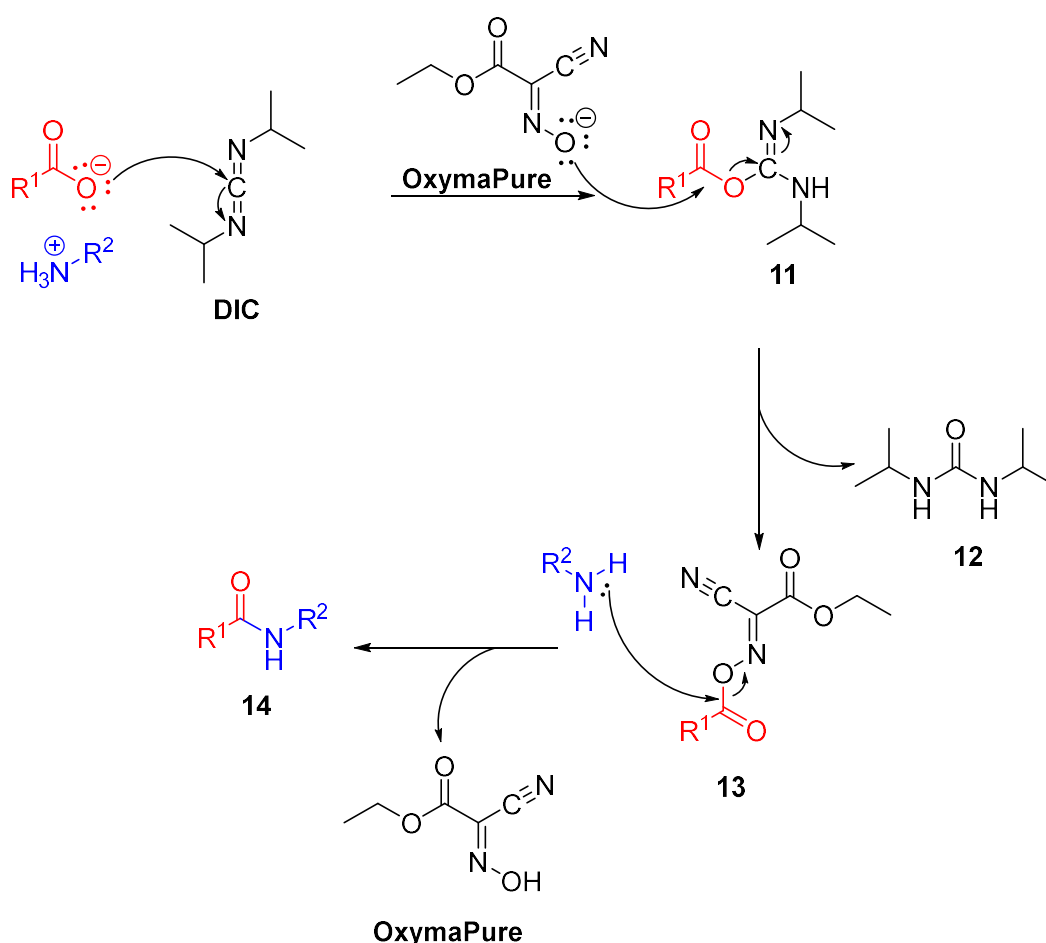
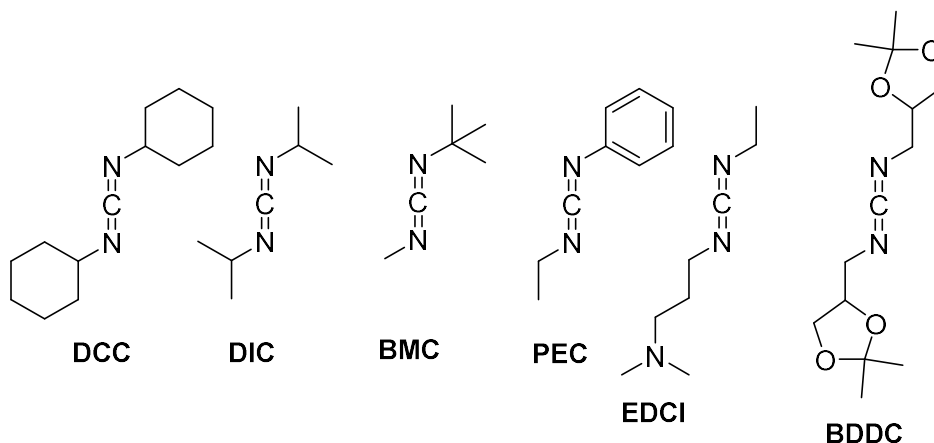


Schéma 8: Mechanismus použití DIC a OxymyPure při syntéze amidu.

2.6.2 Využitelná aditiva a karbodiimidy

Karbodiimidy jsou organické sloučeniny obsahující dva atomy dusíku, které disponují vyšší elektronegativitou než centrální atom uhlíku v *sp* hybridizaci. Díky tomuto selektivnímu poklesu elektronové hustoty jsou tyto sloučeniny vysoce reaktivní a v přítomnosti karboxylové kyseliny tvoří nezbytný ester (*O*-acylisomočoviny).

Na obrázku níže jsou příklady často používaných karbodiimidů. Stopové množství DIC a jeho degradačního produktu (*N,N'*-diisopropylmočoviny) je na rozdíl od *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) a korespondující *N,N'*-dicyklohexylmočoviny snadnější z reakční směsi odstranit, jelikož tyto látky jsou rozpustné ve vodě, která se používá při zpracování reakční směsi. BDDC našlo uplatnění u syntézy, která vyžaduje absenci epimerizace na chirálních centrech. Jednotlivá použití tedy přímo závisí na substrátu a aplikaci syntézy.¹⁰³



Obrázek 13: Příklady komerčně používaných karbodiimidů.

V případě použití samotného karbodiimidu nemusí dojít k selektivnímu průběhu ve prospěch tvorby amidu tak, jak je popsáno na schématu 8, jelikož vzniklá *O*-acylisomočovina (*O*-acylisourea) může v reakčním systému podlehnout až čtyřem rozdílným reakčním cestám. V případě intramolekulárního přesmyku (**b**) dochází ke vzniku *N*-acylmočoviny, což je nevratný termodynamický vedlejší produkt reakce. V případě reakce karboxylové kyseliny (**c**) dochází k tvorbě anhydridu, jehož aminolýzou při tvorbě amidu (**d**) dochází k odštěpení

původní karboxylové kyseliny, což může být problematické při použití karboxylové kyseliny jakožto výchozí látky. Nukleofilní adičně-eliminační intramolekulární cyklizací (*f*) dochází k tvorbě oxazolového derivátu, jenž je poměrně stabilním meziproduktem, který sice podlehně aminolýze za tvorby amidu (*g*), ale to za cenu epimerizace na chirálních centrech případného enantiomeru karboxylové kyseliny. Přímá reakce *O*-acylisomočoviny s aminem (*e*) je možná pouze v případě použití vysoce nukleofilních aminů.^{102,104}

Všem těmto vedlejším reakcím, majícím významný vliv na průběh a finální výtěžek reakce, lze elegantním způsobem zabránit, a to tedy konkrétně vložení aditiv do reakčního systému. Protonací *O*-acylisomočoviny, nukleofilní adicí aditiva a následnou nukleofilní eliminací vzniká ireversibilní termodynamický produkt – močovinový derivát a významný intermediát – aktivní ester, jenž je již standardním adičně-eliminačním mechanismem konvertován na výsledný amid. Tato aditiva nevyžadují vysokou reakční teplotu a zároveň dokážou poskytnout reakce i na komplexnějších substrátech.

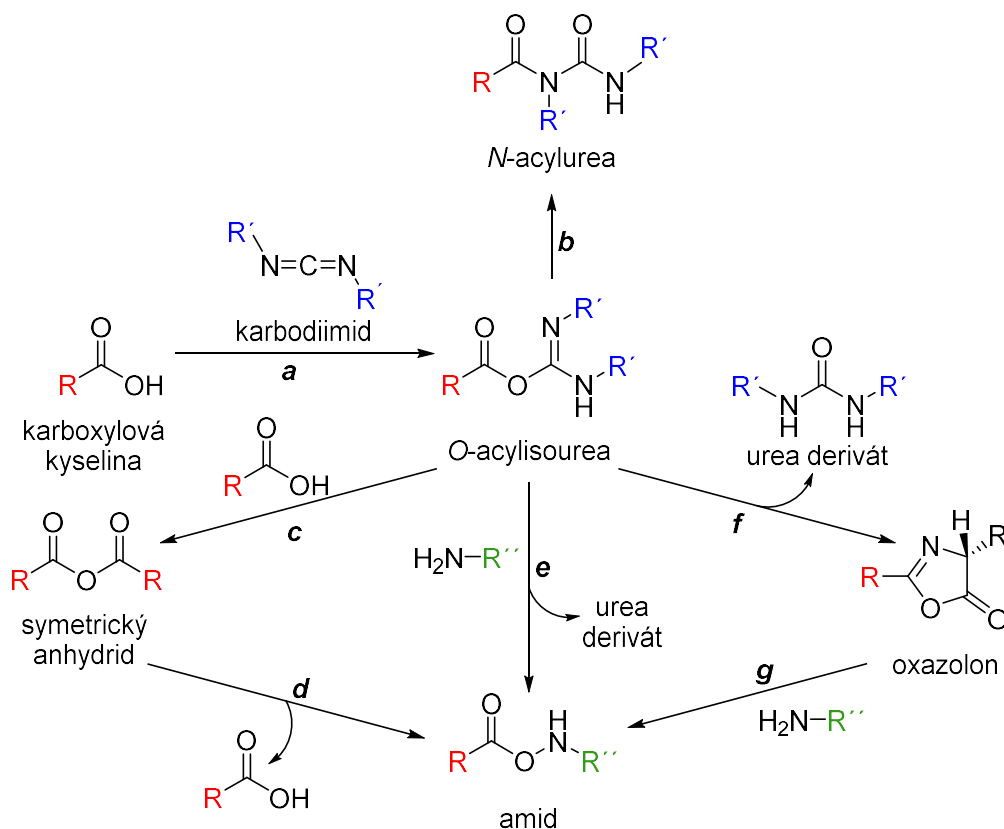
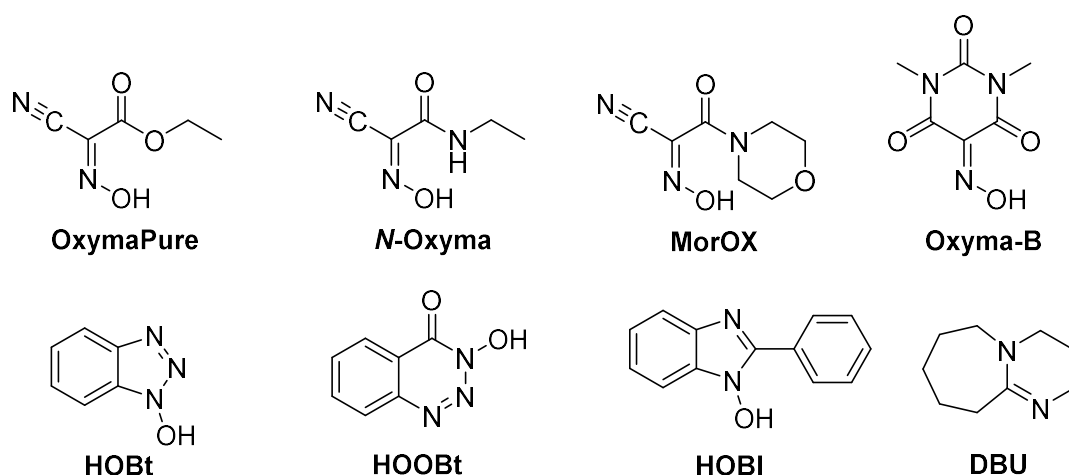


Schéma 9: Možné reakční cesty *O*-acylisomočoviny.

Strukturně jsou tato aditiva přednostně heterocyklické či lineární hydroxylaminy, jejichž specifická elektronová hustota, a to tedy konkrétně indukční záporný efekt dusíku

hydroxylaminu, zajišťuje vysoký elektronový deficit na kyslíku hydroxylaminu. Ten je následně schopen velmi efektivně atakovat a tím stabilizovat reaktivní *O*-acylisomočoviny.

Jako první bylo v roce 1970 Königem a Geigem popsáno první organické stabilizační aditivum hydroxybenztriazol (HOBt), nicméně již řadu let existuje široké spektrum derivátů, které vybočují z původního benzotriazolového skeletu, a to hlavně za účelem redukce epimerizace na chirálních centrech substrátů při syntéze peptidů na pevné fázi, pro niž jsou tato aditiva nezbytná.^{105–108}



Obrázek 14: Příklady aditiv pro karboxyl-aminovou kondenzaci.

2.6.3 Využití

Jako příklad lze uvést syntézu intermediátu při přípravě umělého sekrekantu růstového hormonu (GHS), který je nepeptidickým analogem hexapeptidu uvolňujícího růstový hormon (GHRP-6). Tyto nepeptidické analogy jsou klíčem k levné a dostupné hormonální terapii dětí s nedostatkem růstových hormonů či u prevenci osteoporózy. Na schématu 10 je za poměrně nízké teploty karboxylován laktam **16** pomocí α -*N*-Boc karboxylové kyseliny **15** na amid **17**, který je sérií reakcí konvertován na finální **GHS**.^{109,110}

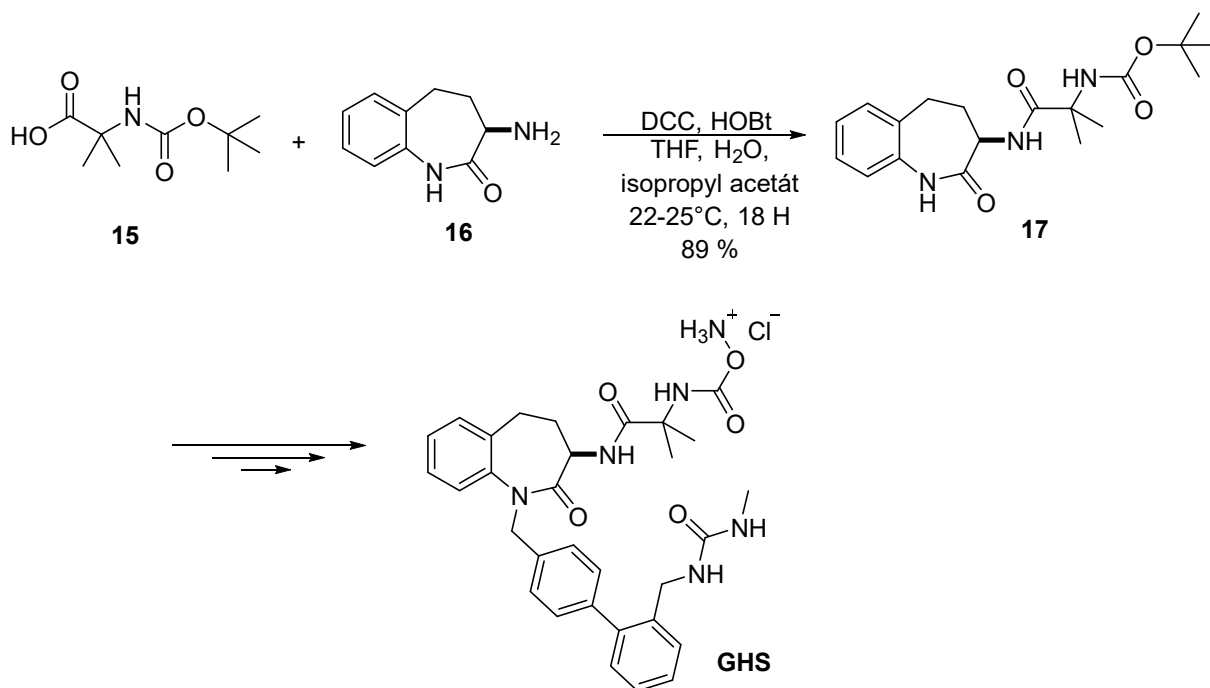


Schéma 10: Příklad využití systému DCC a HOBT při přípravě GHS.

Dalším zajímavým příkladem z oblasti industriální medicíně je finální krok syntézy Rimonabantu I (Acomplia – Sanofi), který je prvním schváleným inhibítor kanabidiolového receptoru CB1, který je mimo jiné významným metabolickým regulátorem. Jeho terapeutické využití spočívá v regulaci apetitu u pacientů, čehož se využívá u léčby diabetu 2. typu, hypertenze a dyslipidémie. Při syntéze se využilo přímé kondenzace 1*H*-pyrazol-3-karboxylové kyseliny **18** s 1-aminopiperidinem s využitím DCC a HOBT jakožto reakčních činidel. Na této syntéze lze vidět posun od původní metodiky, kdy se nejprve z karboxylové kyseliny **18** chlorací SOCl₂ utvoří acyl chlorid **19**, který je poté podroben aminolýze. V moderní metodice shodné struktury bylo dosaženo jedním krokem s vyšším výtěžkem. (Schéma 11).¹¹¹⁻¹¹⁴

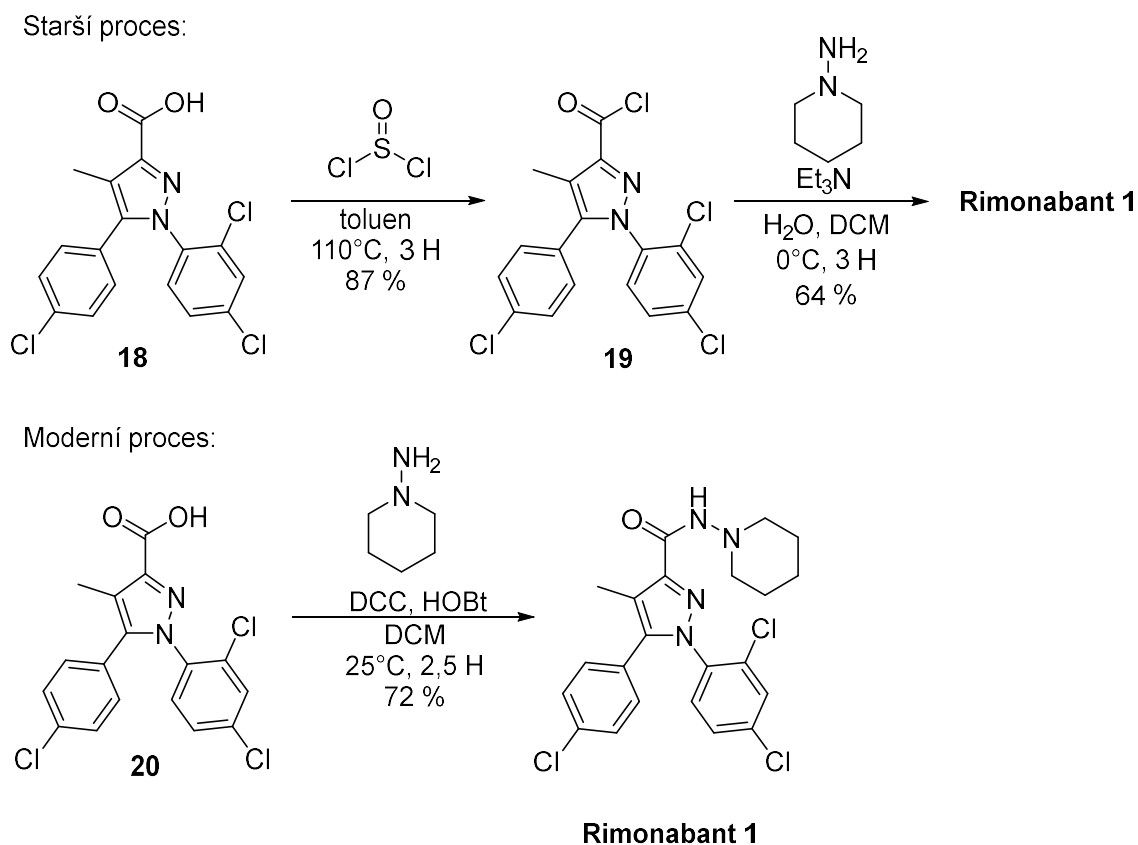


Schéma 11: Využití systému DCC a HOBT při přípravě inhibitoru kanabidiolového receptoru, Rimonabantu 1.

Jako další lze uvést syntézu Eliglustatu 1, který je selektivním inhibitorem glukosylceramidové syntázy, jež je při disfunkci či absenci glukocerebrosidázy zodpovědná za hromadění glukosylceramidu v buňkách retikuloendoteliálního systému, což vede ke zvětšení jater a sleziny, jenž je zodpovědné za vznik Gaucherovy choroby. Tato lipidová tělíska mohou způsobovat špatné fungování těchto orgánů. V roce 2014 byl americkou FDA schválen eliglustat tartát (Cerdelga – Genzyme) pro léčbu Gaucherovy choroby 1. typu. Ve schématu 12 je zobrazena syntéza intermediátu **23**, který vede k finálnímu Eliglustatu 1. Ethyl ester **21** je nejprve podroben hydrolyze, jež generuje volnou karboxylovou kyselinu **22**, která je následně bez dalšího zpracování *in situ* podrobena amidaci s pyrrolidinem, čímž vzniká výsledný amid. Redukcí keto skupiny amidu, deprotekcí dibenzylaminu a amidoformací s modifikovaným oktanoátem je v následujících krocích obdržen výsledný Eligust 1. (Schéma 12).^{115–119}

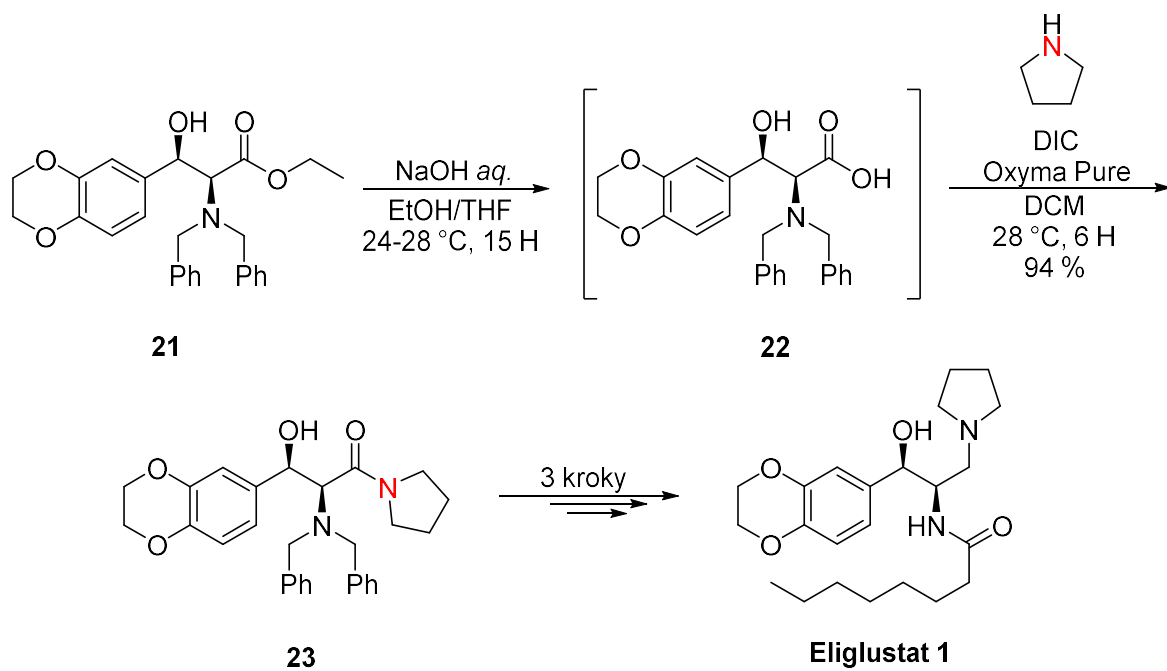


Schéma 12: Příprava intermediátu **23** využitého při syntéze Eliglustatu 1.

3 DISKUSE A VÝSLEDKY

3.1 Design struktur cílových látek

Jak bylo nastíněno v úvodu práce, návrh cílové látky vychází z kombinace dvou biologicky aktivních inhibitorů kináz. Konkrétně je látka **I** hybridem komerčně dostupné látky Palbociclibu, který disponuje selektivní inhibiční aktivitou vůči CDK4/Cyklin D1 ($IC_{50} = 0,011 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a látky AMG 925 s multi-aktivitou vůči CDK4 ($IC_{50} = 0,003 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$); CDK6 ($IC_{50} = 0,008 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a FLT3 ($IC_{50} = 0,002 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$).^{1,3,65}

Základní skelet je analogem biologicky aktivní látky **PPC14-NM-4E**, která byla připravena ve skupině doc. RNDr. Petra Cankaře z Katedry Organické chemie a vykazuje aktivitu vůči CDK4/Cyklin D1 ($IC_{50} = 0,012 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a vůči FLT3 ($IC_{50} = 0,085 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Tyto látky vycházejí z Palbociclibu, a ačkoli se strukturně od Palbociclibu, liší v typu cyklu, mají strukturně podobné vlastnosti (donory a akceptory vodíkových vazeb a lipofilní substituent). Je nutno zmínit, že tyto látky mají různý skelet, ale vždy stejný substituent v poloze 2. Cílem této práce bylo provést modifikaci v této poloze. Substituent, který byl pro tuto modifikaci vybrán, vychází právě z biologicky aktivního duálního inhibitoru AMG 925.⁴

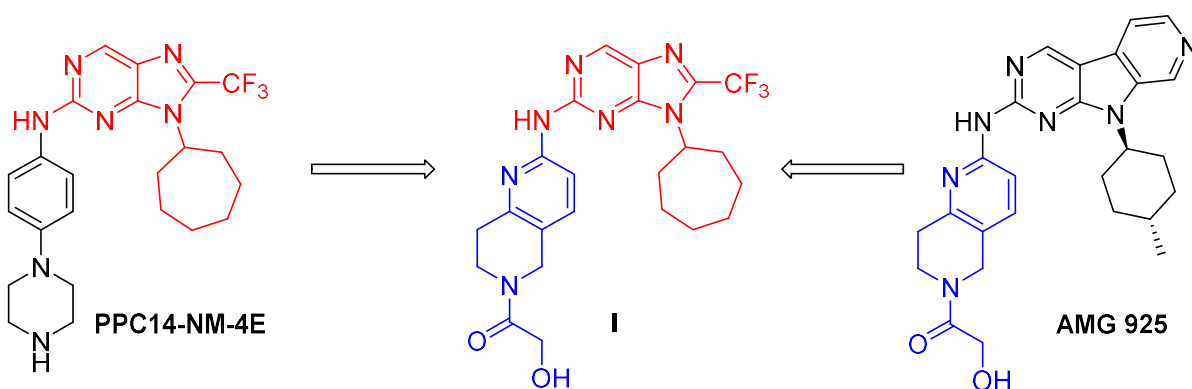


Schéma 13: Design cílové látky **I**.

Dalším cílem bylo připravit dva různé deriváty lišící se substituentem na N konci naftyridinového cyklu a porovnat je celkově i s látkou bez substituentu. Pro tento účel byly navrženy 2 velmi příbuzné substituenty, jejichž biologická aktivita by poskytla více informací o požadavcích substituentu v závislosti na inhibiční koncentraci či selektivitě (Schéma 14). Derivát **II** by obsahoval *N,N'*-dimethylglykolový konec a byl by analogem látky **I**, oproti tomu

látka **III** neobsahuje karbonylovou skupinu, což by přineslo další informaci o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou.

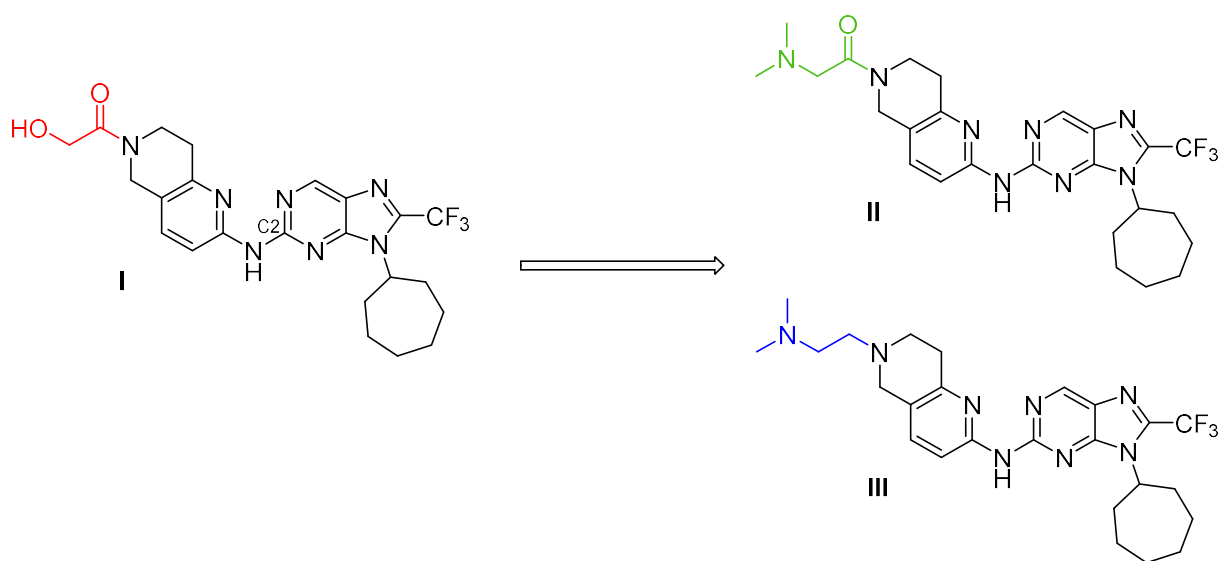


Schéma 14: Struktury navržených látek **II** a **III** jako analogů cílové látky **I**.

3.1.1 Retrosyntetická analýza přípravy inhibitoru I

Pomocí retrosyntetické analýzy byly identifikovány klíčové kroky, které povedou k syntéze duálního inhibitoru I.

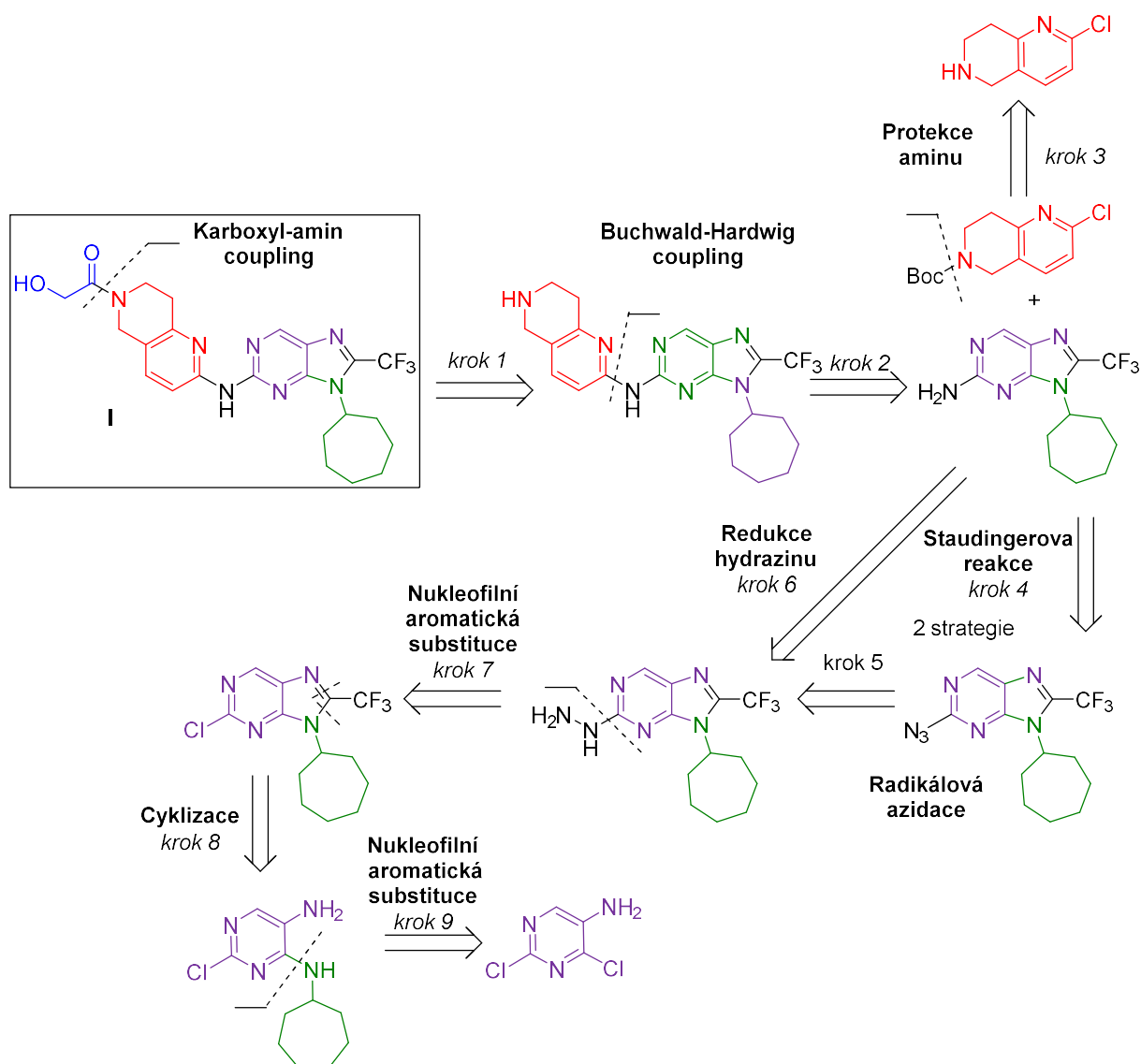


Schéma 15: Retrosyntéza přípravy I.

Glykolová kyselina je připojena prostřednictvím amidické vazby za tvorby finální struktury I. Tato vazba je obdržena standardním N–C couplingem karboxylové skupiny korespondující kyseliny se sekundárním aminem na N konci naftyridinového cyklu (*krok 1*). Shodné syntézy se využívá například k přípravě peptidů na pevné fázi.¹²⁰

Výchozí amin by měl být obdržen standardním palladiem katalyzovaným N-C couplingem, tedy Buchwaldovou-Hartwigovou aminací výchozího arylhalogenidu s arylaminem (*krok 2*).

Volná aminoskupina naftyridinu musí být před vstupem do Buchwaldovy-Hartwigovy aminace ochráněna z důvodu regioselektivity reakce. Chránící skupina byla zvolena *tert*-butyloxykarbonylová skupina (Boc) (*krok 3*).

Buchwald-Hartwigova reakce je reakce mezi halogenidem, v našem případě látky připravené v *kroku 3* a aminoskupnou. V našem případě je aminoskupina na purinové části kruhu a k její syntéze byly navrženy dvě strategie. V obou se vychází z hydrazinového intermediátu. V původní strategii byl hydrazin reagován na azid (*krok 5*), který následně podlehl Staudingerově reakci s trifenyfosfinem na iminofosfaran, jenž byl *in-situ* hydrolyzován na výsledný amin (*krok 4*). Tato strategie se následně prokázala jako neefektivní, a to z důvodu nízkých výtěžků při přípravě azidu. Z tohoto důvodu byla zvolena pro obdržení purinu s volnou aminoskupinou přímá redukce hydrazinového intermediátu (*krok 6*).

Cesta od komerčně dostupného intermediátu je již poměrně přímočará a vede napříč sérií robustních a popsanych S_N^2 reakcí. Na výchozí látku je nejprve regioselektivní nukleofilní substitucí navázán cykloheptylamin (*krok 9*), výsledný 1,2-diamin je poté cyklizován pomocí trifluoracetanhydridu na halogenovaný purin (*krok 8*), který byl následně převeden na hydrazinový derivát pomocí aromatické nukleofilní substituce (*krok 7*).⁴

3.2 Syntéza cílových látek

Nové dualitní inhibitory CDK byly připraveny dle metodologie uvedené v literatuře.^{4,90,121–123}

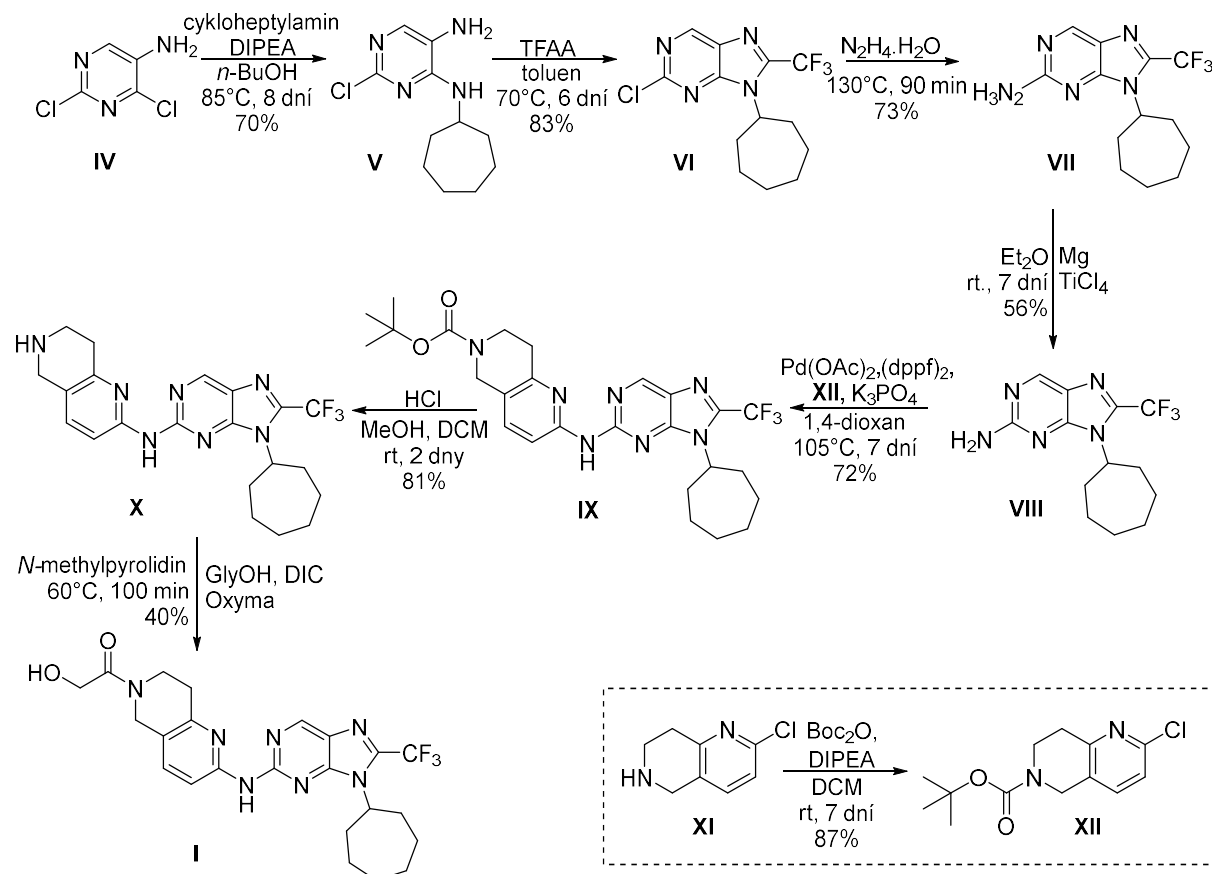


Schéma 16: Přímá syntéza inhibitoru **I**.

K aminu **VIII** se dospělo čtyřkrokovým reakčním sledem. Substitucí chlóru v poloze C4 komerčně dostupného pirimidinu **IV** za cykloheptylamin byl obdržen produkt **V**. Reakce probíhala regioselektivně, a to díky elektronovému deficitu na C4 pirimidinu. Vzniklý 1,2-diamin **V** následně podlehl v kyselém prostředí anhydridu trifluoroctové kyseliny adičně-eliminací na 8-trifluoromethylovaný purin **VI**. Substitucí chlóru na C2 za hydrazin a následnou redukcí aminu **VII** pomocí nízko-valetního titanu v kyselém prostředí byl obdržen klíčový intermediát **VIII**.^{4,90,121–123}

Amin **XI** před druhou klíčovou Buchwald-Hartwigovou aminací podlehl protekci, a to pomocí adičně-eliminací S_N² aminu s di-*tert*-butyldikarbonátem (Boc₂O), čímž byl obdržen *N-tert*-butyldikarbonát **XII**.

Amin naftyridin-purinového kondenzátu **IX** byl následně podroben deprotekcí v kyselém prostředí kyseliny chlorovodíkové.

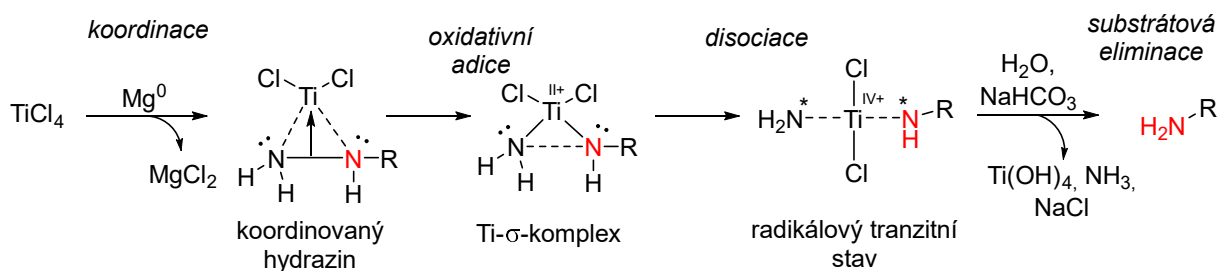
Vzniklý amin **X** byl ve finálním kroku podroben karboxylaci s glykolovou kyselinou, čímž vznikl finální produkt reakční sekvence – inhibitor **I**.

3.2.1 Příprava aminu **VIII**

První tři kroky reakční sekvence dle LC/MS analýz poskytovaly vysoké konverze (>85 % dle integrace). I přes tento fakt byly výtěžky reakčních izolátů relativně k integracím nižší, a to z důvodu nedokonalé izolace. Z časových důvodů a na základě toho, že se jednalo o rychle reprodukovatelné syntézy na počátku reakční sekvence, tomu vědomě nebyla věnována přílišná pozornost. Problém nastal u syntézy azidu, při níž došlo pouze k velmi nízké konverzi (<30 % dle integrace). V tomto bodě syntézy došlo ke změně strategie vedoucí k obdržení aminu **VIII**, a tedy bylo od původní Staudingerovy syntézy upuštěno a klíčový intermediát **VIII** byl syntetizován pomocí elektrofilní radikálové redukce hydrazinu **VII** titanem v nízkém oxidačním stavu. Tato optimalizace reakční sekvence byla navržena mnou, jakožto autorem této práce.¹²²

Dle charakteru reakce byl navržen pravděpodobný mechanismus (Schéma 17). Na počátku reakce probíhá prostá *in situ* redukce inaktivního TiCl_4 do reaktivního TiCl_2 a to pomocí velmi jemného hořčíkového prášku. Vzniklý elektrofilní TiCl_2 je v přítomnosti hydrazinového substrátu pravděpodobně nejprve koordinován na N–N vazbu, která postupně podléhá napříč Ti- σ -komplexem vlivem vysokého rozdílu elektronových hustot oxidativní adici. Při oxidativní adici dojde ke kompletní inkorporaci titanu do N–N vazby. Při tomto procesu, popsatelném jako elektrofilní inserce, dochází k homolýze hydrazinové skupiny, což popisuje teoretický radikálový tranzitní stav. K formaci produktu následně dochází až při pravé oxidaci titanu zpět do stavu $\text{Ti}^{\text{IV}+}$. Titan reakcí s kyselým uhličitanem ztrácí své elektrofilní schopnosti, díky čemuž dochází k akutní destabilizaci jeho ligandového pole, což způsobí odstup bývalých skupin hydrazinu. V protickém prostředí simultánně dochází k protonaci těchto radikálů, což je hlavní termodynamickou hnací silou reakce, jelikož pouze v tomto bodě dochází k tvorbě irreverzibilního produktu.

Mechanismus vzniku aminu z hydrazinového intermediátu:



Mechanismus degradace:

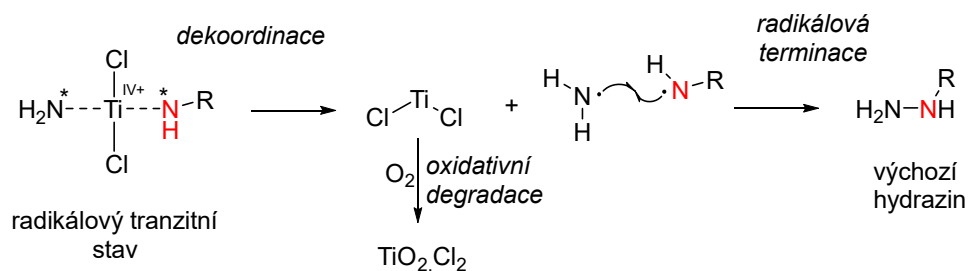


Schéma 17: Obecný reakční mechanismus titanem moderované deaminace hydrazinu.

Reakce poskytovala průměrné izolační výtěžky (<60 %), a to ve všech čtyřech experimentech, které však byly dostačující pro pokračování v syntéze. Dle LC/MS analýzy obsahovala reakční směs výchozí látku **VII**. Ta mohla vzniknout, jak je znázorněno ve schématu 17, radikálovou terminací. Průběh této vedlejší reakce je podpořen vysokou reaktivitou TiCl_2 vůči kyslíku, který způsobí jeho oxidaci, a tedy i ireverzibilní degradaci. Tento problém by se teoreticky dal řešit průběhem reakce při nižší koncentraci, což by ale mohlo mít negativní vliv na vznik klíčového σ -komplexu.

Možnou variantou je také zvýšení mol % reaktivního TiCl_2 , což by teoreticky zajistilo vyšší výtěžky, ale to pouze za předpokladu vysoké selektivity vůči $\text{N}-\text{N}$ vazbě hydrazinu.

Autoři zdrojové práce¹²² tuto reakci přednostně využívají u přípravy jednoduchých alkyl/aryl aminů z korespondujících hydrazinů, u kterých byla zaznamenána vysoká konverze >70 %, a to právě díky specifické elektronové hustotě $\text{N}-\text{N}$ vazby hydrazinu, která disponuje relativně nízkou disociační energií ($\Delta H_{f298} = 297$ kJ/mol) oproti $\text{C}-\text{C}$ vazbě ($\Delta H_{f298} = 347-377$ kJ/mol).

Nicméně pro hypotetické vysokokapacitní použití je tato reakce více než nevhodná, a to hlavně z důvodu nízké konverze. Do budoucna pro syntézu možných derivátů **VIII** by měla být tedy navržena reakční sekvence, jež využití radikálové deaminace nevyžaduje.

3.2.2 Příprava intermediátu IX

Buchwaldova-Hartwigova aminace podle původního postupu (4.2.7-Metoda A: Katalýza pomocí systému BrettPhos Pd G3, str.60) probíhala s dostatečnou konverzí (70 %), avšak finální izolace produktu byla problematická, přestože bylo možno produkt vykrytalovat z izolátu reakční směsi pomocí MeOH. Hlavní problém tkvěl ve vysoké afinitě ligandu BrettPhos G3 vůči produktu syntézy IX. Byla testována variace mobilních fází i rozpouštědel na krystalizaci (MeOH, EtOH, BuOH, MeCN). Žádný z těchto postupů bohužel nedokázal efektivně odstranit zbytky tohoto relativně lipofilního ligandu. Přídavná optimalizace izolační metody byla zhodnocena jako neefektivní, jelikož by v jejím průběhu pravděpodobně docházelo ke značným ztrátám produktu.

#	PdX	Ligand	XII (ekv.)	Báze	Teplota	Konverze dle LC-MS	Rozpouštědlo
1	BrettPhos Pd G3, 5 mol%		1	Cs ₂ CO ₃ , 2 ekv.	130°C	12%	1,4-dioxan
2	BrettPhos Pd G3, 5 mol%		3	Cs ₂ CO ₃ , 2 ekv.	100°C	20%	1,4-dioxan
3	BrettPhos Pd G3, 10 mol%		1,5	Cs ₂ CO ₃ , 2 ekv.	100°C	71%	1,4-dioxan
4	BrettPhos Pd G3, 10 mol%		1,5	Cs ₂ CO ₃ , 2 ekv.	100°C	55%	1,4-dioxan
5	BrettPhos Pd G3, 10 mol%		1,5	Cs ₂ CO ₃ , 2 ekv.	100°C	23%	1,4-dioxan
6	XPhos Pd G2, 10 mol%		1	K ₃ PO ₄ , 4 ekv.	100°C	<10%	1,4-dioxan/H ₂ O (4:1)
7	Pd(Oac) ₂ 10 mol%	(dppf) ₂ , 20 mol%	1,5	K ₃ PO ₄ , 4 ekv.	105°C	44%	1,4-dioxan
8	Pd(Oac) ₂ 10 mol%	(dppf) ₂ , 20 mol%	2,5	K ₃ PO ₄ , 4 ekv.*	105°C	72%	1,4-dioxan

Tabulka 1: Optimalizace B-H aminace; Podmínky: Inertní atmosféra N₂; 0,1 mmol VIII; CEM Discover SP – dynamický režim; 2 h; *báze přidána po iniciační době

Z tohoto důvodu byly provedeny optimalizace, které využívají jiných dialkylbiarylfosfinových ligandů, které byly z dynamických důvodů reakce vloženy do systému tak, aby byl samotný prekatalyzátor generován z ligandu *in situ*. Reprezentační metoda (4.2.7-Metoda B: Katalýza pomocí systému Pd(Oac)₂/(dppf)₂, str 60) je modifikací postupu převzatého z literatury (2.5.3-Schéma 4: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze BTK inhibitoru GDC-0853⁹⁰, str. 33) popisující regioselektivní B-H aminaci při syntéze GDC-0825. Tato optimalizace byla navržena mnou, jakožto autorem této práce.⁹⁰

Před zjištěním problematiky s vysokou afinitou ligandu byla provedena optimalizace s využitím samotného BrettPhos Pd G3, z tohoto důvodu budou tyto výsledky do tabulky zahrnuty také.

Snížením teploty o 30 °C a zvýšením poměru arylhalogenidu byla konverze zvýšena o 10 %, což je viditelné u prvních dvou optimalizací. Na tomto jde pozorovat relativně nízká stabilita ligandu, který v průběhu katalytických cyklů degraduje, čímž ztrácí esenciální koordinační vlastnosti na palladium.

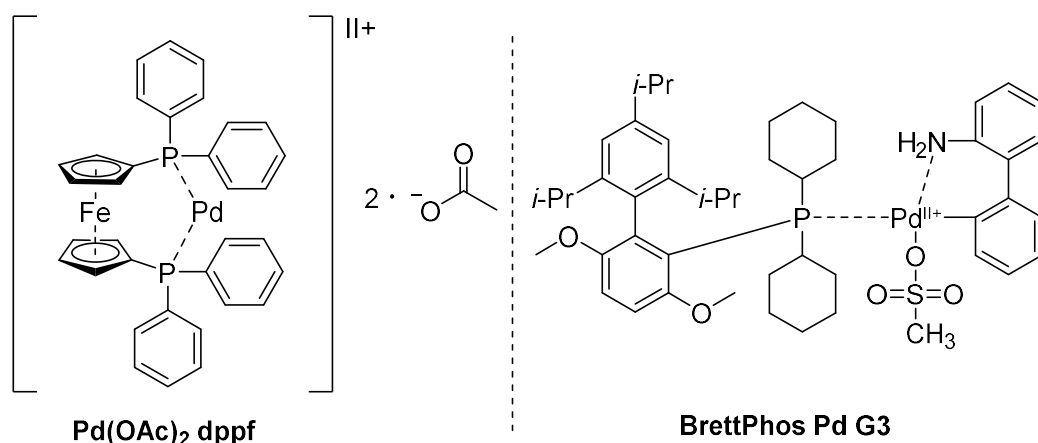
Při ztrátě koordinačních vlastností ligandu dochází k rozpuštění kovového palladia, které může utvářet agregáty, jež se ochotně usazují na stěnách baňky. Tyto agregáty již nedisponují kýženými katalytickými vlastnostmi, ba naopak mohou výhradně poškozovat substrát arylhalogenidu.

Při třetí optimalizaci byl snížen poměr arylhalogenidu a zvýšen podíl prekatalyzátoru na 10% mol, což vedlo k překvapivě přijatelným výsledkům, které jsou popsány v experimentální části (4.2.7-Metoda A: Katalýza pomocí systému BrettPhos Pd G3, str 60). Nicméně při dvou snaženích o reprodukci, ve kterých byla zvýšena navážka všech reagentů (o jednotky mmol), bylo zjištěno, že tato procedura není reprodukovatelná pro vyšší navážky (desítky mmol), což je další z důvodů, proč od systému BrettPhos Pd G3 bylo upuštěno.

U optimalizace využívající Xphos Pd G2 byla využita směs rozpouštědel s vodou, což má reprodukovat podmínky používané běžně u Suzuki-Miyaura reakcí, bohužel v tomto případě docházelo pouze k velmi nízké konverzi.

Poslední dvě optimalizace vycházely z postupu dostupného v literatuře, který popisoval *in-situ* formaci prekatalyzátoru z relativně dobře rozpustného diacetátu palladnatého a ligandu (*dppf*)₂. Tento systém poskytl zajímavé výsledky, z tohoto důvodu byla provedena další optimalizace, při které byl zvýšen podíl arylhalogenidu a upraven přídavek báze.⁹⁰

Myšlenka uskutečnit přídavek báze až po iniciační době vycházela z předpokladu skutečnosti její nutné potřeby až ve finální fázi reakce – reduktivní eliminaci. Vysoký výtěžek reakce tedy pravděpodobně tkví v destrukci komplexu po koordinaci aminu na palladový komplex s již koordinovaným aryl halogenidem. V tomto případě totiž pravděpodobně nedochází k interferenci komplexu sází, která může negativně ovlivňovat jeho ligandové pole, a tedy i schopnost vázat arylamin a arylhalogenid.



Obrázek 15: Komplexy $\text{Pd(OAc)}_2 \text{ dppf}$ a BrettPhos Pd G3 použité v syntéze **IX**.

Výhodou poslední optimalizace je skutečnost používání poměrně levných činidel, které dokáží moderovat systémy i ve větších navážkách (desítky mmol).

3.2.3 Příprava aminu **II**

Inhibitor **II** měl být obdržen standardním amidovým couplingem dle metody (4.2.10 – *příprava finální látky I, str. 63*), a to za totožných navážek a podmínek s obměnou kyseliny glykolové za *N,N*-dimethylglycin.

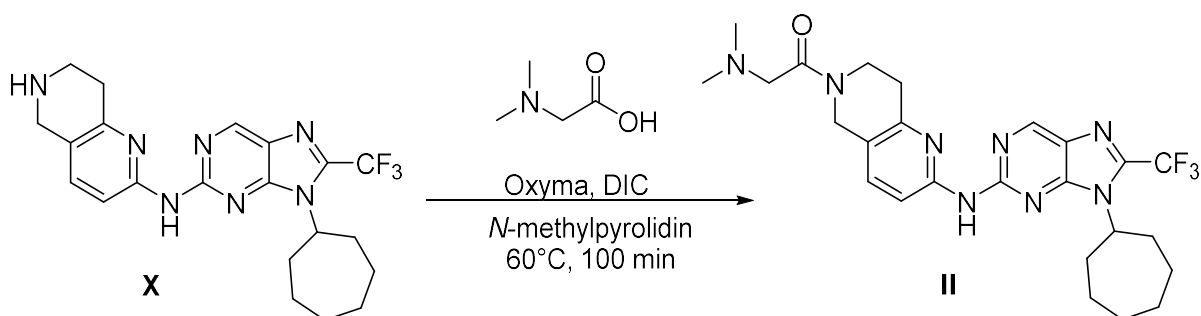


Schéma 18: Přímá syntéza derivátu **II** pomocí karboxyl-aminové kondenzace **X** s *N,N*-dimethylglycinem.

Reakce probíhala ve srovnání s přípravou inhibitoru **I** rapidně pomaleji. Toto bylo pozorováno na integraci LC/MS spektra po 90 minutách, tedy v době, kdy měla být reakční procedura již u konce. Z tohoto důvodu byl reakční čas nastaven z původních 90 minut na 20 hodin, po kterých byl produkt **III** na spektru pozorován pouze z 10 %. Další optimalizace již nebyly z časových důvodů provedeny.

3.2.4 Příprava intermediátu XIII pro syntézu aminu III

Původní strategie syntézy derivátu **III** zahrnovala nukleofilní alifatickou substituci komerčně dostupné výchozí látky **XI** s 2-chloro-*N,N*-dimethylethanaminem **XIV**. Výsledný produkt **XIII** měl být následně podroben již optimalizovanému B-H couplingu (4.2.7-Metoda B: Katalýza pomocí systému $Pd(OAc)_2/(dppf)_2$, str. 60) s aminem **VIII**

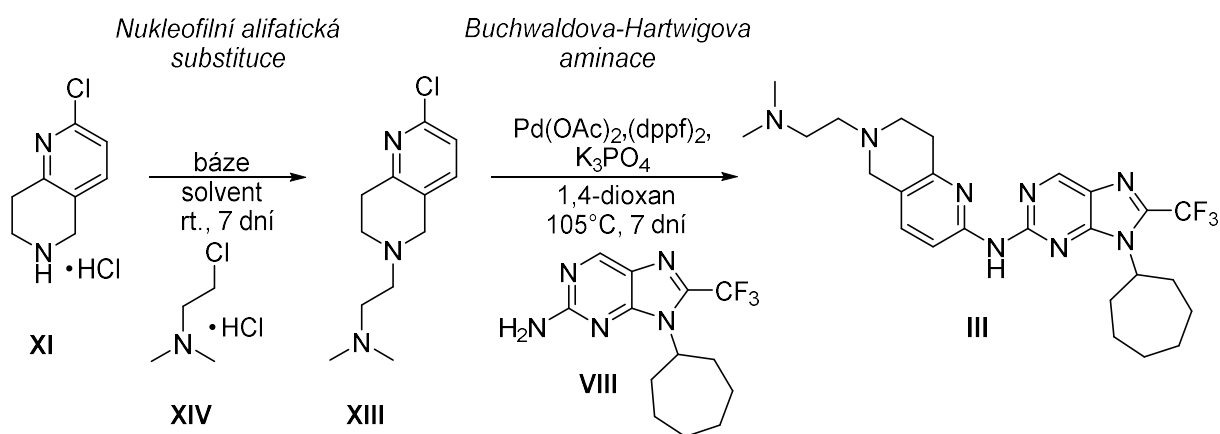


Schéma 19: Přímá syntéza **II** pomocí BH aminace z modifikovaného ligandu **XIII**.

Pro reakci byly testovány různé báze a rozpouštědla. Jelikož jsou výchozí komponenty hydrochloridy, bylo využito nadbytku báze.

#	XIV (ekv.)	Báze (ekv.)	Teplota	Konverze	Rozpouštědlo
1	1 ekv.	DIPEA, 4 ekv.	rt	<10%	DMSO
2	1 ekv.	K_2CO_3 , 4 ekv.	rt	<10%	MeOH/ H_2O (1:1)
3	3 ekv.	CS_2CO_3 , 8,1 ekv.	rt	<10%	DMSO
4	3 ekv.	K_3PO_4 , 8,1 ekv.	rt	<10%	DMSO
5	3 ekv.	Et_3N , 8,1 ekv.	rt	<10%	DMSO

Tabulka 2: Optimalizace alifatické S_N2 ; Podmínky: čas reakce 168 h, kónická vialka.

Žádná z optimalizací nepřinesla kýžené výsledky. Další možnou optimalizací by mohla být zvýšená teplota, nicméně z důvodu možné vedlejší reakce, kdy by naftyridin **XI** reagoval prostřednictvím řetězové polymerace sám se sebou, jsme od tohoto optimalizačního kroku opustili.

Pro syntézu látky **II** by bylo možné využít přímé alkylace látky **X** s 2-chloro-*N,N'*-dimethylethanaminem, to však již z časových důvodů nebylo testováno.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Obecné informace o aplikované metodice

Následující syntéza byla provedena s použitím komerčně dostupných chemikálií a rozpouštědel (MERCK, Acros, Fluorochem, VWR, PENTA). Není-li uvedeno jinak, pak nebyly nijak čištěny a byly použity v surovém stavu dodání. Nebylo-li nezbytně nutné, pak nebyla pro syntézu použita suchá rozpouštědla.

Syntézy probíhaly v běžném laboratorním vybavení z borosilikátového skla. Míchání bylo zajištěno pomocí laboratorních magnetických míchaček Heidolph Hei-Tec a magnetickými míchadly pokrytých PTFE. Ohřev byl zprostředkován buď lázněmi naplněnými silikonovým olejem, nebo hliníkovými bloky. Chlazení bylo zprostředkováno směsí vody a ledu (0 až 5 °C) nebo směsí MeOH a ledu (-10 až -15 °C), nižší teploty pak směsí pevného CO₂ a acetonu. Není-li uvedeno jinak, byly reakce provedeny beze snahy vyloučit vzdušnou vlhkost nebo atmosférický kyslík za laboratorní teploty v těsně uzavřených suchých zábrusových baňkách, které nebyly žíhány. Reakce vyžadující ohřev byly provedeny s použitím zpětného chladiče, v horní části opatřené CaCl₂ desikační zátkou. Průběh reakcí byl monitorován pomocí UPLC/MS nebo prostřednictvím tenkovrstvé chromatografie na silikagelem pokrytých hliníkových destičkách Merck 60 F₂₅₄ impregnovaných fluorescenčním indikátorem, které byly vizualizovány pomocí UV záření ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

LC/MS analýzy byly měřeny na přístroji UPLC Waters Acquity spojeného s PDA a QDA detektory. Systém se skládá z kolony XSelect HSS T3 (Waters) 3 mm x 50 mm na reverzní fázi s C18 částicemi o velikosti 2 až 5 μm a porozitě 100 Å. Mobilní fáze byla tvořena (A) 0,01 M octanem amonným a (B) MeCN. Obvykle byla použita metoda Ac-Fast s gradientem od 20 % do 80 % polárního MeCN v 5,50 min při průtoku 0,6 ml/min.

¹H NMR a ¹³C NMR experimenty byly měřeny na přístroji JEOL o síle magnetu 9.39 T, měřícího při frekvenci 400 MHz pro jádra ¹H, nebo 100 MHz pro jádra ¹³C. Měření probíhalo standardně při teplotě 27 °C. NMR spektra byla referencována vzhledem k signálu zbytkových rozpouštědel, tj. DMSO-*d*₆ (¹H: $\delta = 2.50 \text{ ppm}$; ¹³C: $\delta = 39.51 \text{ ppm}$), nebo CDCl₃ (¹H: $\delta = 7.260 \text{ ppm}$; ¹³C: $\delta = 77.160 \text{ ppm}$).

HRMS analýzy byly měřeny na přístroji UPLC Dionex Ultimate 3000 využívajícího hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite s vysokým rozlišením. Nastavení elektrospreje bylo následující: teplota kapiláry 150 °C a napětí zdroje 3,6 kV. Získaná data byla kalibrována vnitřním standardem – diisooktyl ftalátem v MeOH (m/z 391,2843).

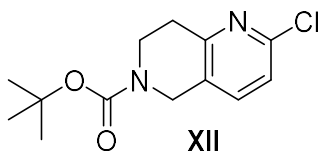
Body tání byly měřeny na bodotávku PHMK 78/1742 VEB Analytik Dresden s podsvíceným mikroskopem.

Reakce v mikrovlnném reaktoru byly provedeny v CEM Discover SP closed vessel microwave synthesizer s použitím skleněných vial uzavřených silikonovým víčkem (s ochrannou vrstvou PTFE).

4.2 Příprava cílových látek

Duální inhibitor **I** byl připraven dle metodologie uvedené v literatuře.^{4,90,121–123}

4.2.1 *tert*-Butyl 2-chloro-7,8-dihydro-1,6-naphthyridin-6(5*H*)-karboxylát (**XII**)



Ke směsi Boc₂O (3,93 g; 17,99 mmol) a **XI** (2,84 g; 13,86 mmol) v bezvodém DCM (30 ml) byl přidán DIPEA (2,60 ml; 14,54 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Poté byla směs promyta vodou (3 x 20 ml), solankou (1 x 20 ml), vysušena nad bezvodým MgSO₄, přefiltrována přes křemelinu a odpařena na rotační vakuové odparce. Surový odparek byl srážen ze směsi DCM/hexan, čímž se získal první podíl **XII** (2,00 g; 54 %) ve formě bílého prášku. Odpařením matečného louhu a jeho srážením ze směsi DCM/hexan byl získán druhý podíl **XII** (1,22 g; 33 %) ve formě bílého prášku.

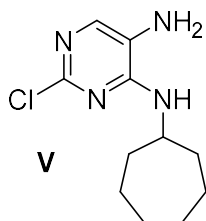
Teplota tání: 86–88 °C (DCM/hexan).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.56 (s, 2H), 3.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 154.8, 149.0, 146.9, 137.0, 128.0, 122.1, 85.3, 80.5, 30.2, 28.6, 27.6 ppm.

HRMS vypočteno pro $C_{13}H_{17}ClN_2O_2$ $[M + H]^+$ 269,1051; nalezeno 269,1054.

4.2.2 2-Chlor- N^4 -cykloheptylpyrimidin-4,5-diamin (V)



Ke směsi **IV** (2,11 g; 12,89 mmol) v *n*-BuOH (100 ml) byl přidán DIPEA (4,50 ml; 25,78 mmol) a následně cykloheptylamin (1,64 ml; 12,89 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 85 °C, 8 dní. Poté byla odpařena na rotační vakuové odparce a přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, hexan/EtOAc 1:2 až 1:4). Produkt **V** byl získán ve formě oranžového prášku (2,19 g; 70 %).

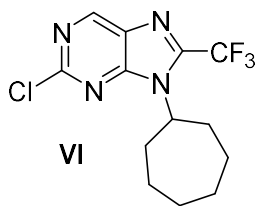
Teplota tání: 120-134 °C (odparek).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.35 (s, 1H), 6.55 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.08 - 3.98 (m, 1H), 1.93 - 1.85 (m, 2H), 1.68 - 1.40 (m, 10H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 152.4, 147.0, 135.5, 126.9, 50.9, 34.0, 28.0, 23.6 ppm.

HRMS vypočteno pro $C_{11}H_{17}ClN_4$ $[M + H]^+$ 241,1214; nalezeno 241,1220.

4.2.3 2-Chlor-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purin (VI)



Ke směsi pyrimidinu **V** (0,50 g; 2,08 mmol) v toluenu (3 ml) byl přidán anhydrid kyseliny trifluoroctové (11 ml). Reakční směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 6 dnů. Poté byla odpařena na RVO a odparek rozdělen mezi DCM (15 ml) a 20% vodný roztok K_2CO_3 (40 ml). Vodná fáze byla extrahována do DCM (4 x 10 ml). Spojené organické extrakty byly vysušeny bezvodým $MgSO_4$, přefiltrovány přes křemelinu a odpařeny na RVO. Purin **VI** byl získán ve formě žlutého oleje (0,55 g; 83 %). Získaný olej měl dostatečnou čistotu pro další experimenty. Malá část byla krystalizována ze směsi DCM/hexan pro účely měření bodu tání.

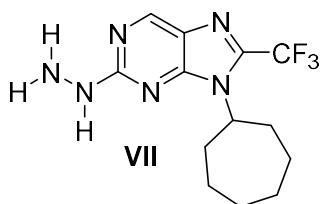
Teplota tání: 72-76 °C (DCM/hexan)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 9.08 (s, 1H), 4.64 – 4.54 (m, 2H), 2.71 – 2.59 (m, 2H), 2.04 – 1.90 (m, 4H), 1.77 – 1.69 (m, 4H), 1.64 – 1.53 (m, 2H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 155.8, 153.7, 152.7, 143.1 (q, J = 39 Hz), 131.6, 118.5 (q, J = 272 Hz), 61.3, 33.7, 27.3, 23.5 ppm.

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 319,0932; nalezeno 319,0932.

4.2.4 9-Cykloheptyl-2-hydrazinyl-8-(trifluoromethyl)-9H-purin (VII)



Směs chloridu VI (0,54 g; 1,69 mmol) a hydrazinu monohydrátu (10,0 ml; 132,97 mmol) byla zahřívána pod zpětným chladičem na 130 °C po dobu 90 minut. Vzniklý roztok byl následně ochlazen na laboratorní teplotu a ponechán ke krystalizaci v lednici při teplotě 3-5 °C (14 dní). Výsledná krystalická látka byla ze suspenze světle rudé kapaliny zfiltrována, vysušena v exsikátoru a rekrystalizována z 1 ml EtOH. Výsledný produkt VII byl získán ve formě bílého krystalického prášku (0,39 g; 73 %).

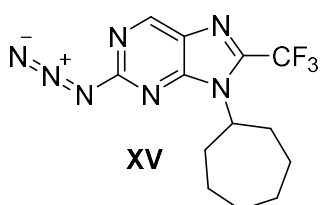
Teplota tání: 100–104 °C (EtOH).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.81 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.49 - 4.43 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 2.67 - 2.58 (m, 4H), 2.00 - 1.86 (m, 4H), 1.74 - 1.49 (m, 6H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 162.1, 153.7, 152.5, 139.2 (q, J = 39 Hz), 126.9, 118.9 (q, J = 272 Hz), 60.2, 33.4, 27.6, 25.4 ppm.

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 315,1539; nalezeno 315,1536.

4.2.5 2-Azido-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purin (XV)



Do 25 ml slzovité baňky byl navážen hydrazin VII (0,50 g; 1,59 mmol). Následně byla přidána ledová kyselina octová (2 ml), dusitan sodný (0,11 g; 1,63 mmol) a 1M vodný roztok HCl (1,7 ml). Heterogenní směs byla chráněná před světlem hliníkovou fólií a míchána za

laboratorní teploty 7 dní. Vzniklá nažloutlá pevná látka byla z reakční směsi filtrována a promyta vodou (20 ml). Další přečištění pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, hexan/EtOAc 4:1) poskytlo azid **XV** ve formě nažloutlého amorfního prášku (0,12 g; 23 %).

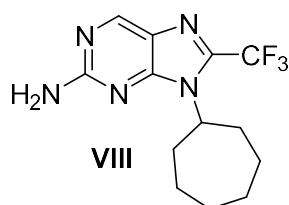
Teplota tání: 62-64 °C (*n*-hexan/EtOAc).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.05 (s, 1H), 4.60 – 4.51 (m, 1H), 2.68 – 2.57 (m, 2H), 2.02 – 1.89 (m, 4H), 1.75 – 1.51 (m, 6H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 158.1, 153.7, 152.7, 142.2 (q, *J* = 39 Hz), 129.9, 118.6 (q, *J* = 272 Hz), 61.0, 33.6, 27.4, 25.2 ppm.

HRMS vypočteno pro C₁₃H₁₄F₃N₇ [M + H]⁺ 326,1336; nalezeno 326,1336.

4.2.6 9-Cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9*H*-purin-2-amin (**VIII**)



Do 50 ml vyžíhané kulové baňky v inertní atmosféře N₂ byl navážen hořík (0,30 g; 12,26 mmol) a suspendován ve směsi bezvodého Et₂O (2,5 ml) a DCM (10 ml). Následně byl opatrně přidán TiCl₄ (0,56 ml; 5,06 mmol). Vzniklá směs byla míchána za laboratorní teploty 3 hodiny. Poté byl do vzniklého žlutého roztoku přidán hydrazin **VII** (0,40 g; 1,26 mmol) a reakce míchána za laboratorní teploty 7 dní. Následně byla reakce ukončena přidávkem nasyceného vodného roztoku NaHCO₃ (20 ml), naředěna EtOAc a přefiltrována přes křemelinu. Extrakce filtrátu do EtOAc a sloupcová chromatografie (silikagel, DCM/MeOH 40:1) poskytla amin **VIII** ve formě naoranžovělé pevné látky (0,21 g; 56 %).

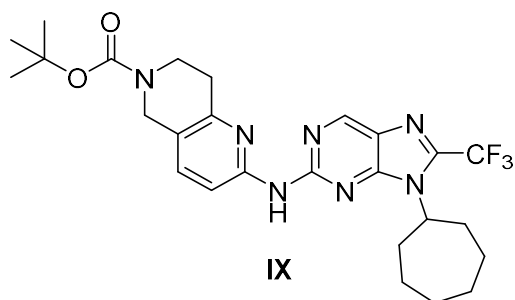
Teplota tání: 200-207 °C (MeOH/DCM).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.77 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.47 – 4.39 (m, 1H), 2.65 – 2.55 (m, 2H), 1.97 – 1.84 (m, 4H), 1.73 – 1.63 (m, 4H), 1.59 – 1.48 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 160.3, 154.0, 152.4, 139.3 (q, *J* = 39 Hz), 126.8, 118.9 (q, *J* = 270 Hz), 60.2, 33.4, 27.4, 25.4 ppm.

HRMS vypočteno pro C₁₃H₁₇F₃N₅ [M + H]⁺ 300,1431; nalezeno 300,1427.

4.2.7 *tert*-Butyl 2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5*H*)-karboxylát (IX)



Metoda A: Katalýza pomocí systému BrettPhos Pd G3

Do vyžíhané 10 mL tlustostěnné vialky pro mikrovlnný reaktor byl přidán **VIII** (42,0 mg; 0,14 mmol), **XII** (56,56 mg; 0,21 mmol), CsCO₃ (91,43 mg; 0,28 mmol) a palladiový prekatalyzátor BrettPhos Pd G3 (10 % mol; 12,72 mg; 0,014 mmol). Směs krystalických činidel byla ve vialce septem uzavřena, a pod inertním N₂ 30 minut profoukávána. Následně byl do uzavřeného systému pod septem inertního N₂ přidán deoxygenovaný 1,4-dioxan (650 µl). Suspenze byla 5 minut ultrazvukována. Reakce probíhala za silného míchání v mikrovlnném reaktoru při 100 °C, 150 W, 2 h. Zchlazená reakční směs, nastavená 5 ml saturovaného vodného roztoku NH₄Cl, naředěna 8 ml EtOAc, byla filtrována přes široký sloupec křemeliny (1,5 g) a znovu přefiltrována. Filtrát byl podroben extrakci (3 x 10 ml; EtOAc), spojené organické extrakty byly sušeny nad bezvodným MgSO₄, zfiltrOVány a ze směsi 100 ml (EtOAc/petrol-ether; 24:36) zahuštěny na RVO. Surový odparek (100 mg) byl naředěn MeOH (2 ml), zfiltrOVán na Hirschově nálevce a 3× promyt ledovým MeOH, čímž byla obdržena bílá krystalická látka **IX** (53 mg; 71%).

Metoda B: Katalýza pomocí systému Pd(OAc)₂/(dppf)₂

Do vyžíhané 9 ml kónické reakční vialky s **VII** (192 mg; 0,64 mmol), **XII** (689,58 mg; 2,56 mmol), (dppf)₂ (71,12 mg; 0,13 mmol; 20 mol %) a Pd(OAc)₂ (14,4 mg; 0,06 mmol; 10 mol %). Homogenní směs krystalických látek byla 30 minut profoukávána N₂ a následně suspendována deoxygenovaným 1,4-dioxanem (5 ml). Směs, utěsněná teflonovým septem, byla zahřívána za stálého míchání (≥ 800 rpm.) v olejové lázni při teplotě 105 °C po dobu 30 minut. Následně byl přidán K₃PO₄ (544,68 mg; 2,56 mmol) a reakční směs byla zahřívána 4 dny. Surová reakční směs byla podrobena sloupcové chromatografii

(silikagel; DCM/EtOAc 1:1) a rekrystalizaci z MeOH (6,4 ml) čímž byl obdržen amin **IX** ve formě bílé krystalické látky (245 mg; 72 %)

Níže uvedená analytická data byla měřena z aminu **IX** získaného *metodou B*.

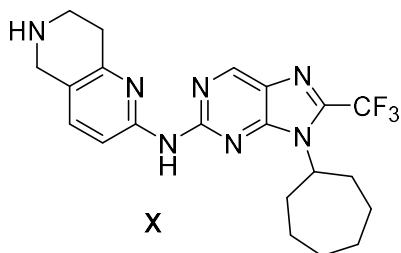
Teplota tání: 217-219 °C (MeOH)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 9.01 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.35 – 8.30 (m, Hz, 1H), 7.50 – 7.39 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.56 – 4.40 (m, 1H), 3.76 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.93 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.81 – 2.54 (m, 2H), 2.07 – 1.97 (m, 2H), 1.97 – 1.88 (m, 2H), 1.87 – 1.67 (m, 4H), 1.65 – 1.54 (m, 3H), 1.51 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ = 155.9, 154.9, 153.2, 152.9, 152.7, 150.8, 139.97 (q, J = 39 Hz), 136.0, 127.5, 122.1, 118.9 (q, J = 272 Hz), 110.6, 80.2, 60.7, 44.9, 42.0, 40.7, 33.5, 32.0, 28.6, 27.3, 25.0 ppm.

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 532,2642; nalezeno 532,2642

4.2.8 *N*-(9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amin (**X**)



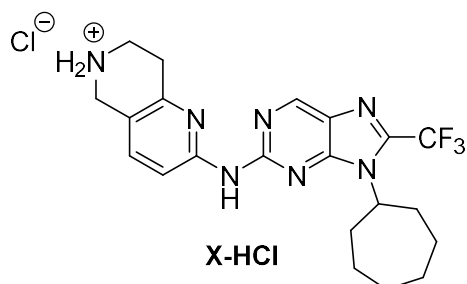
Do 9 ml kónické tlustostěnné vialky s rozpuštěným **IX** (198 mg; 0,37 mmol) ve směsi DCM/MeOH (6,97 ml; 1:1), byla přidána koncentrovaná HCl (0,6 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 168 hodin a poté byl DCM odpařen z reakční směsi za sníženého vakua. K surové směsi byl přidán nasycený roztok Na_2CO_3 (12 ml) a produkt byl extrahován 4 x 30 ml EtOAc. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel; DCM/MeOH 8:1) a produkt **X** byl získán ve formě světle žluté krystalické látky (130 mg; 81 %).

Teplota tání: 221-228 °C (DCM)

^1H a ^{13}C NMR bylo měřeno ve formě hydrochloridu, kvůli špatné rozpustnosti podle postupu uvedeného níže. (viz. 3.2.9)

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 432,2118; nalezeno 432,2118

4.2.9 *N*-(9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amonium chlorid (**X-HCl**)



V 5 ml vialce byl rozpuštěn **X** (20,2 mg; 0,046 mmol) ve 2 ml MeOH nasyceným plynným chlorovodíkem na koncentraci 3,29 mol/l. Směs byla míchána 30 minut a poté byly rozpouštědla odfoukány proudem dusíku. Po dosušení na lyofilizátoru byl produkt získán ve formě žluté krystalické látky **X-HCl** (23,14 mg; 98 %)

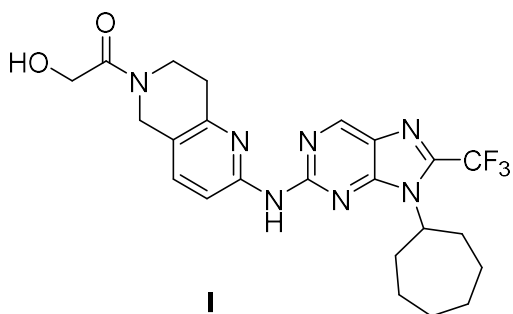
Teplota tání: 261-263 °C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.91 (s, 1H), 10.02 (s, 2H), 9.20 (s, 1H), 8.17 – 8.11 (m, 1H), 7.92 – 7.88 (m, 1H), 4.30 – 4.25 (m, 2H), 3.51 – 3.43 (m, 2H), 3.18 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.57 (qd, J = 11.8, 3.6 Hz, 2H), 2.08 – 1.97 (m, 2H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.76 – 1.61 (m, 4H), 1.59 – 1.49 (m, 2H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 154.7, 152.4, 152.0, 150.4, 147.6, 139.5, 139.3 (q, J = 40 Hz), 139.1, 127.44, 119.05, 118.3 (q, J = 273 Hz), 115.32, 111.86, 60.0, 42.2, 32.8, 26.8, 26.5, 24.3 ppm.

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 432,2118; nalezeno 432,2118.

4.2.10 1-(2-((9-Cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9H-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5H)-yl)-2-hydroxyethan-1-on (I)



V 5 ml kónické vialce byl v *N*-methylpyrolidinu (760 μ l) suspendován **X** (69,57 mg; 0,16 mmol), kyselina glykolová (13,46 mg; 0,17 mmol) a OxymaPure (21,03 mg; 0,14 mmol). Směs byla následně zahřívána na 60 °C po dobu 20 minut. Následně byl přidán DIC (27,52 μ l; 0,24 mmol) a směs byla udržována při stejné reakční teplotě 90 min. Po zchladnutí, nastavení Milli Q H₂O (30 ml), extrakcí do EtOAc (3 x 40 ml) a kolonové chromatografii (silikagel; DCM/MeOH 100:1 až 20:1) byl obdržen surový podíl (74 mg). Surový podíl, rozpuštěný ve směsi (MeCN/DMSO/TFA; 8 : 0,3 : 0,25; 3 ml) byl podroben semi-preparativní chromatografii (reverzní fáze; MeCN/TFA 0,1 % v Milli-Q H₂O; 4:6; 6 min). Eliminací MeCN na RVO, neutralizací K₂CO₃ (10 %; 2,7 ml), extrakcí do DCM (6 x 50 ml), zahuštěním na RVO a finální lyofilizací byla obdržena bílá krystalická látka **I** (31 mg; 40 %)

Teplota tání: 240-246 °C (DCM).

¹H NMR ¹³C NMR bylo měřeno při 75°C, jelikož při teplotě 27°C byla v analýze pozorována směs dvou rotamerů.

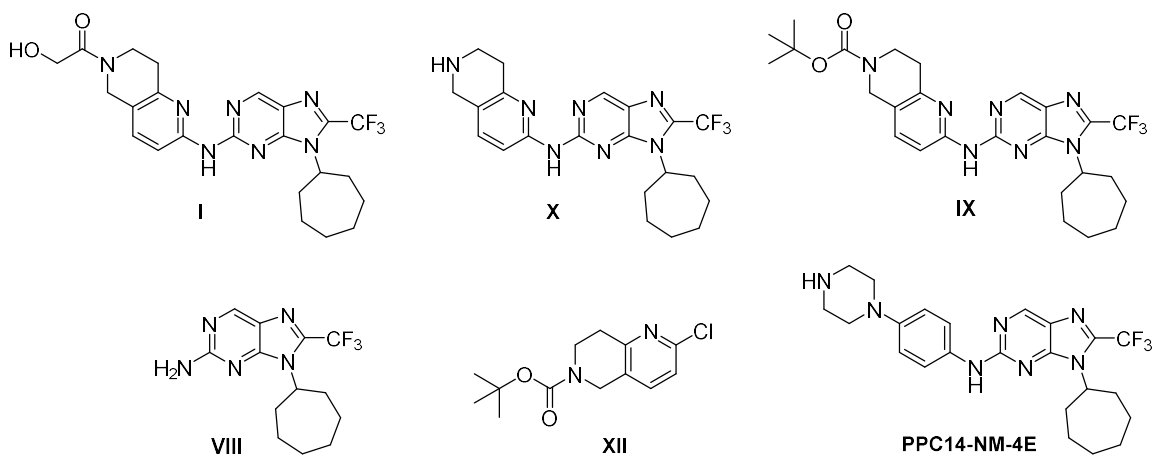
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.63 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.22 – 8.04 (m, 1H), 7.73 – 7.55 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.53 – 4.45 (m, 1H), 4.44 – 4.47 (br.s., 1H), 4.24 – 4.18 (br.s., 2H), 3.77 (s, 2H), 2.89 (s, 2H), 2.70 – 2.57 (m, 2H), 2.04 – 1.96 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 4H), 1.61 – 1.50 (m, 2H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.2, 155.6, 152.3, 152.0, 150.6, 138.1 (q, *J* = 38 Hz), 135.4, 126.5, 122.20, 118.4 (q, *J* = 273 Hz), 110.5, 60.1, 59.5, 32.6, 26.5, 24.1 ppm.

HRMS vypočteno pro C₂₃H₂₆F₃N₇O₂ [M + H]⁺ 490,2172; nalezeno 490,2173.

5 INHIBICE PROTEINOVÝCH KINÁZ A CYTOTOXICITA

Cílová látka **I** a její intermediáty (**VIII**, **IX**, **X-HCl** a **XII**) byly testovány na biologickou aktivitu v externí Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci. Látka **X** oproti cílové látce **I** nemá navázanou glykolovou kyselinu, látka **IX** má navíc oproti **X** navázanou Boc protektivní skupinu. Otestovat se dala i látka bez dihydronaftyridinu **VIII** a také samostatný dihydronaftyridin **XII** (Obrázek 16). Z výsledků, které jsme obdrželi na buněčné linie K562, MV4-11 (leukemické) MCF-7 (linie rakoviny prsu) a z enzymů na CDK2/cyklinE, CDK4/cyklinD1 a FLT3-ITD, lze vyčíst, že aktivní jsou pouze dvě látky, a to látky **I** a **X**, přičemž aktivnější je látka **X**, bez substituce glykolovou kyselinou (Tabulka 3). Látky vykazují řádově srovnatelnou aktivitu s dříve připravenou látkou **PPC14-NM-4E**.



Obrázek 16: Struktury látek zaslaných na biologickou aktivitu, včetně výchozí **PPC14-NM-4E**

	Označení	Buněčné linie GI50 (μM)			Enzymy IC50 (μM)		
		K562	MV4-11	MCF-7	CDK2/E	FLT3-ITD	CDK4/D
1	I	22,5	7,3	15,6	>25	6,8	>25
2	IX	>50	>50	>50	>25	>25	>25
3	X	5,7	3,1	9,0	6,05	3,775	1,355
4	VIII	>100	40,1	>100	>200	28,7	65,1
5	XII	>100	97,4	>100	>200	>100	>200
6	PPC14-NM-4E	2,45	0,25	2,6	0,15	0,088	0,022

Tabulka 3: Výsledky biologické aktivity vybraných látek.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byl vypracován komplexní přehled od základního mechanismu buněčného cyklu, přes jeho regulaci pomocí přirozených faktorů až po selektivní inhibici proteinových kinas, a to výhradně inhibici CDK4 a CDK6, prostřednictvím přírodních i syntetických inhibitorů. Druhá hlavní část zpracované literární rešerše je věnována popisu Buchwald-Hartwigovy aminace a karboxyl-aminové kondenzace, činidlům, katalyzátorům, mechanismům a praktickému použití těchto reakcí nejen v medicíně, ale i v medicíně.

V diskusní části byly rozebírány jednotlivé reakční kroky vedoucí k syntéze navržených cílových látek. Klíčovým krokem v syntéze bylo připravit intermediát **VIII** s volnou aminoskupinou. Ten byl dále podroben Buchwald-Hartwigově reakci s dihydronaftyrdinem **XII** protekovaným Boc chránicí skupinou. Dle původního návrhu syntézy měl být klíčový amin **VIII** připraven Staudingerovou redukcí azidu, ta ovšem poskytovala velmi nízké konverze. Tento problém byl vyřešen využitím přímé redukce hydrazinové skupiny intermediátu **VII**, prostřednictvím titanu v nízkém valenčním stavu, jejíž využití bylo navrženo mnou, jakožto autorem této práce. K této redukci je v této práci přiložen i pravděpodobný mechanismus, jehož zmínky nejsou v literatuře zatím dostupné.

Při syntéze intermediátu **IX**, prostřednictvím Buchwaldovy-Hartwigovy couplingové reakce, byla provedena optimalizace, která poskytla produkt o vyšší čistotě a s vyšší konverzí.

Všechny připravené látky byly plně charakterizovány pomocí dostupných analytických metod (HRMS, ^1H , ^{13}C NMR a teplota tání). Veškeré reprodukovatelné postupy, společně se zápisy z výše jmenovaných analytických metod, jsou uvedeny v experimentální části práce. Šest z osmi připravených látek jsou nové struktury, doposud nepopsané v literatuře.

Tato práce si kladla za cíl připravit nové potenciálně aktivní duální inhibitory lidských proteinových kináz. Tento cíl byl splněn, cílová látka **I** byla připravena v sedmikrokové syntéze v dostatečném výtěžku a čistotě pro biologické testování. Z výsledků biologické aktivity látka vykazuje střední aktivity proti leukemickým buněčným liniím a buněčné linii rakoviny prsu. Byly otestovány i vybrané intermediáty. Zajímavým výsledkem je, že látka **X**, tedy bez substituce glykolovou kyselinou vykazuje na vybraných buněčných liniích lepší aktivity než cílová látka **I**. V porovnání s látkou dříve připravenou ve skupině doc. RNDr. Petra Cankaře, Ph.D. **PPC14-NM-4E** jsou výsledky o něco malo nižší, ale řádově

srovnatelné. Z těchto výsledků lze předpokládat, že pro aktivitu je dobrá přítomnost volné NH skupiny, jakožto donora vodíkové vazby, v substituentu v poloze 2, což je důležitý poznatek pro přípravu dalších strukturálně příbuzných látek.

Tato práce tedy poskytuje komplexní náhled do problematiky inhibice proteinových kináz prostřednictvím cílených syntetických inhibitorů. Metody a poznatky popisované v experimentální a diskusní části jsou přímo aplikovatelné v syntéze strukturálně příbuzných látek, nejen ze skupiny inhibitorů CDK, které budou díky nim moct být připraveny rychleji a efektivněji.

Oblast aplikované organické chemie, potažmo medicínské chemie byla mnou, jakožto autorem této práce zvolena z důvodu zájmu o tyto obory. V budoucnu bych se chtěl v této oblasti nadále pohybovat.

7 BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM

- (1) Fry, D. W.; Harvey, P. J.; Keller, P. R.; Elliott, W. L.; Meade, M. A.; Trachet, E.; Albassam, M.; Zheng, X. X.; Leopold, W. R.; Pryer, N. K.; Toogood, P. L. Specific Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 by PD 0332991 and Associated Antitumor Activity in Human Tumor Xenografts. *Mol Cancer Ther* **2004**, *3* (11), 1427–1438.
- (2) Chen, P.; Xu, Y.; Li, X.; Yao, H.; Lin, K. Development and Strategies of CDK4/6 Inhibitors. *Future Med Chem* **2020**, *12* (2), 127–145.
- (3) Li, Z.; Wang, X.; Eksterowicz, J.; Gribble, M. W.; Alba, G. Q.; Ayres, M.; Carlson, T. J.; Chen, A.; Chen, X.; Cho, R.; Connors, R. v.; Degraffenreid, M.; Deignan, J. T.; Duquette, J.; Fan, P.; Fisher, B.; Fu, J.; Huard, J. N.; Kaizerman, J.; Keegan, K. S.; Li, C.; Li, K.; Li, Y.; Liang, L.; Liu, W.; Lively, S. E.; Lo, M. C.; Ma, J.; McMinn, D. L.; Mihalic, J. T.; Modi, K.; Ngo, R.; Pattabiraman, K.; Piper, D. E.; Queva, C.; Ragains, M. L.; Suchomel, J.; Thibault, S.; Walker, N.; Wang, X.; Wang, Z.; Wanska, M.; Wehn, P. M.; Weidner, M. F.; Zhang, A. J.; Zhao, X.; Kamb, A.; Wickramasinghe, D.; Dai, K.; McGee, L. R.; Medina, J. C. Discovery of AMG 925, a FLT3 and CDK4 Dual Kinase Inhibitor with Preferential Affinity for the Activated State of FLT3. *J Med Chem* **2014**, *57* (8), 3430–3449.
- (4) Tomanová, M.; Kozlanská, K.; Jorda, R.; Jedinák, L.; Havlíková, T.; Řezníčková, E.; Peřina, M.; Klener, P.; Dolníková, A.; Cankař, P.; Kryštof, V. Synthesis and Structural Optimization of 2,7,9-Trisubstituted Purin-8-Ones as FLT3-ITD Inhibitors. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (24).
- (5) Galderisi, U.; Jori, F. P.; Giordano, A. Cell Cycle Regulation and Neural Differentiation. *Oncogene* **2003**, *22* (33), 5208–5219.
- (6) Panagopoulos, A.; Altmeyer, M. The Hammer and the Dance of Cell Cycle Control. *Trends Biochem Sci* **2021**, *46* (4), 301–314.
- (7) Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A. Kinase Drug Discovery 20 Years after Imatinib: Progress and Future Directions. *Nat Rev Drug Discov* **2021**, *20* (7), 551–569.

- (8) Collins, I.; Garrett, M. D. Targeting the Cell Division Cycle in Cancer: CDK and Cell Cycle Checkpoint Kinase Inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* **2005**, *5* (4), 366–373.
- (9) Leal-Esteban, L. C.; Fajas, L. Cell Cycle Regulators in Cancer Cell Metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2020**, *1866* (5).
- (10) Swaffer, M. P.; Jones, A. W.; Flynn, H. R.; Snijders, A. P.; Nurse, P. CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell* **2016**, *167* (7), 1750–1761.
- (11) Ding, L.; Cao, J.; Lin, W.; Chen, H.; Xiong, X.; Ao, H.; Yu, M.; Lin, J.; Cui, Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (6).
- (12) Kanev, G. K.; de Graaf, C.; de Esch, I. J. P.; Leurs, R.; Würdinger, T.; Westerman, B. A.; Kooistra, A. J. The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases. *Trends Pharmacol Sci* **2019**, *40* (11), 818–832.
- (13) McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S. Dynamic Architecture of a Protein Kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (43), 4623–4631.
- (14) Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N.; Taylor, S. S.; ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M. 2.2 Å Refined Crystal Structure of the Catalytic Subunit of CAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with MnATP and a Peptide Inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1993**, *49* (3), 362–365.
- (15) Ung, P. M. U.; Schlessinger, A. DFGmodel: Predicting Protein Kinase Structures in Inactive States for Structure-Based Discovery of Type-II Inhibitors. *ACS Chem Biol* **2015**, *10* (1), 269–278.
- (16) Brown, N. R.; Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. The Structural Basis for Specificity of Substrate and Recruitment Peptides for Cyclin-Dependent Kinases. *Nat Cell Biol* **1999**, *1* (7), 438–443.
- (17) Endicott, J. A.; Noble, M. E. M.; Johnson, L. N. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annu Rev Biochem* **2012**, *81*, 587–613.
- (18) Baker, S. J.; Reddy, E. P. CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes Cancer* **2012**, *3* (11–12), 658–669.

- (19) Kaldis, P.; Russo, A. A.; Chou, H. S.; Pavletich, N. P.; Solomon, M. J. Human and Yeast Cdk-Activating Kinases (CAKs) Display Distinct Substrate Specificities. *Mol Biol Cell* **1998**, *9* (9), 2545–2560.
- (20) Frade, J. M.; Ovejero-Benito, M. C. Neuronal Cell Cycle: The Neuron Itself and Its Circumstances. *Cell Cycle* **2015**, *14* (5), 712–720.
- (21) Williams, G. H.; Stoeber, K. The Cell Cycle and Cancer. *Journal of Pathology* **2012**, *226* (2), 352–364.
- (22) Miyaoka, Y.; Ebato, K.; Kato, H.; Arakawa, S.; Shimizu, S.; Miyajima, A. Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. *Curr Biol* **2012**, *22* (13), 1166–1175.
- (23) Nurse, P.; Thuriaux, P.; Nasmyth, K. Genetic Control of the Cell Division Cycle in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*. *MGG Molecular & General Genetics* **1976**, *146* (2), 167–178.
- (24) Nurse, P.; Bissett, Y. Gene Required in G1 for Commitment to Cell Cycle and in G2 for Control of Mitosis in Fission Yeast. *Nature* **1981**, *292* (5823), 558–560.
- (25) Iino, Y.; Hiramane, Y.; Yamamoto, M. The Role of Cdc2 and Other Genes in Meiosis in *Schizosaccharomyces Pombe*. *Genetics* **1995**, *140* (4), 1235–1245.
- (26) Malumbres, M. Cyclin-Dependent Kinases. *Genome Biol* **2014**, *15* (122).
- (27) Morikawa, M.; Derynck, R.; Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2016**, *8* (5).
- (28) Endicott, J. A.; Noble, M. E.; Tucker, J. A. Cyclin-Dependent Kinases: Inhibition and Substrate Recognition. *Curr Opin Struct Biol* **1999**, *9* (6), 738–744.
- (29) Gil, J.; Peters, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a Tumour Suppressor Locus: All for One or One for All. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7* (9), 667–677.

- (30) Rane, S. G.; Dubus, P.; Mettus, R. v.; Galbreath, E. J.; Boden, G.; Reddy, E. P.; Barbacid, M. Loss of Cdk4 Expression Causes Insulin-Deficient Diabetes and Cdk4 Activation Results in β -Islet Cell Hyperplasia. *Nat Genet* **1999**, *22* (1), 44–52.
- (31) Rane, S. G.; Cosenza, S. C.; Mettus, R. v.; Reddy, E. P. Germ Line Transmission of the Cdk4 R24C Mutation Facilitates Tumorigenesis and Escape from Cellular Senescence. *Mol Cell Biol* **2002**, *22* (2), 644–656.
- (32) Blain, S. W. Switching Cyclin D-Cdk4 Kinase Activity on and Off. *Cell Cycle* **2008**, *7* (7), 892–898.
- (33) Larrea, M. D.; Liang, J.; da Silva, T.; Hong, F.; Shao, S. H.; Han, K.; Dumont, D.; Slingerland, J. M. Phosphorylation of P27 Kip1 Regulates Assembly and Activation of Cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol* **2008**, *28* (20), 6462–6472.
- (34) James, M. K.; Ray, A.; Leznova, D.; Blain, S. W. Differential Modification of P27 Kip1 Controls Its Cyclin D-Cdk4 Inhibitory Activity. *Mol Cell Biol* **2008**, *28* (1), 498–510.
- (35) Bagui, T. K.; Jackson, R. J.; Agrawal, D.; Pledger, W. J. Analysis of Cyclin D3-Cdk4 Complexes in Fibroblasts Expressing and Lacking P27 Kip1 and P21 Cip1. *Mol Cell Biol* **2000**, *20* (23), 8748–8757.
- (36) Kitagawa, M.; Higashi, H.; Jung, H. K.; Suzuki-Takahashi, I.; Ikeda, M.; Tamai, K.; Kato, J. Y.; Segawa, K.; Yoshida, E.; Nishimura, S.; Taya, Y. The Consensus Motif for Phosphorylation by Cyclin D1-Cdk4 Is Different from That for Phosphorylation by Cyclin A/E-Cdk2. *EMBO Journal* **1996**, *15* (24), 7060–7069.
- (37) Grafstrom, R. H.; Pan, W.; Hoess, R. H. Defining the Substrate Specificity of Cdk4 Kinase-Cyclin D1 Complex. *Carcinogenesis* **1999**, *20* (2), 193–198.
- (38) Denechaud, P. D.; Fajas, L.; Giralt, A. E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2017**, *8* (311).
- (39) Kachhap, S. K.; Rosmus, N.; Collis, S. J.; Kortenhorst, M. S. Q.; Wissing, M. D.; Hedayati, M.; Shabbeer, S.; Mendonca, J.; Deangelis, J.; Marchionni, L.; Lin, J.; Höti, N.; Nortier, J. W. R.; Deweese, T. L.; Hammers, H.; Carducci, M. A. Downregulation of

Homologous Recombination DNA Repair Genes by HDAC Inhibition in Prostate Cancer Is Mediated through the E2F1 Transcription Factor. *PLoS One* **2010**, *5* (6).

- (40) Zhang, M.; Zhang, L.; Hei, R.; Li, X.; Cai, H.; Wu, X.; Zheng, Q.; Cai, C. CDK Inhibitors in Cancer Therapy, an Overview of Recent Development. *Am J Cancer Res* **2021**, *11* (5), 1913–1935.
- (41) Spíchal, L.; Kryštof, V.; Paprskářová, M.; Lenobel, R.; Stýskala, J.; Binarová, P.; Cenklová, V.; de Veylder, L.; Inzé, D.; Kontopidis, G.; Fischer, P. M.; Schmülling, T.; Strnad, M. Classical Anticytokinins Do Not Interact with Cytokinin Receptors but Inhibit Cyclin-Dependent Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (19), 14356–14363.
- (42) Gajdošová, S.; Spíchal, L.; Kamínek, M.; Hoyerová, K.; Novák, O.; Dobrev, P. I.; Galuszka, P.; Klíma, P.; Gaudinová, A.; Žižková, E.; Hanuš, J.; Dančák, M.; Trávníček, B.; Pešek, B.; Krupička, M.; Vaňková, R.; Strnad, M.; Motyka, V. Distribution, Biological Activities, Metabolism, and the Conceivable Function of Cis-Zeatin-Type Cytokinins in Plants. *J Exp Bot* **2011**, *62* (8), 2827–2840.
- (43) Silva-Navas, J.; Conesa, C. M.; Saez, A.; Navarro-Neila, S.; Garcia-Mina, J. M.; Zamarreño, A. M.; Baigorri, R.; Swarup, R.; del Pozo, J. C. Role of Cis-Zeatin in Root Responses to Phosphate Starvation. *New Phytologist* **2019**, *224* (1), 242–257.
- (44) Darzynkiewicz, Z.; Ardelt, B.; Skierski, J. S.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. Different Effects of Staurosporine, an Inhibitor of Protein Kinases, on the Cell Cycle and Chromatin Structure of Normal and Leukemic Lymphocytes. *Cancer Res* **1992**, *52* (2), 470–473.
- (45) Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. v.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A Quantitative Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nat Biotechnol* **2008**, *26* (1), 127–132. <https://doi.org/10.1038/nbt1358>.
- (46) Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchiya, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R. A New Alkaloid Am-2282 Of Streptomyces Origin Taxonomy,

- Fermentation, Isolation And Preliminary Characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1977**, *30* (4), 275–282.
- (47) Kryštof, V.; Lenobel, R.; Havlíček, L.; Kuzma, M.; Strnad, M. Synthesis and Biological Activity of Olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (22), 3283–3286.
- (48) Ruef, J.; Meshel, A. S.; Hu, Z.; Horaist, C.; Ballinger, C. A.; Thompson, L. J.; Subbarao, V. D.; Dumont, J. A.; Patterson, C. Flavopiridol Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation in Vitro and Neointimal Formation in Vivo after Carotid Injury in the Rat. *Circulation* **1999**, *100* (6), 659–665.
- (49) Harmon, A. D.; Weiss, U.; Silverton, J. v. The Structure of Rohitukine, the Main Alkaloid of Amoorá Rohituka (Syn. Aphanamixis Polystachya) (Meliaceae). *Tetrahedron Lett* **1979**, *20* (8), 721–724.
- (50) Mihara, M.; Shintani, S.; Nakashiro, K. I.; Hamakawa, H. Flavopiridol, a Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitor, Induces Apoptosis by Regulating Bcl-x in Oral Cancer Cells. *Oral Oncol* **2003**, *39* (1), 49–55.
- (51) Cimini, A.; d'Angelo, M.; Benedetti, E.; D'Angelo, B.; Laurenti, G.; Antonosante, A.; Cristiano, L.; di Mambro, A.; Barbarino, M.; Castelli, V.; Cinque, B.; Cifone, M. G.; Ippoliti, R.; Pentimalli, F.; Giordano, A. Flavopiridol: An Old Drug With New Perspectives? Implication for Development of New Drugs. *J Cell Physiol* **2017**, *232* (2), 312–322.
- (52) Yousuf, M.; Khan, P.; Shamsi, A.; Shahbaaz, M.; Hasan, G. M.; Haque, Q. M. R.; Christoffels, A.; Islam, A.; Imtaiyaz Hassan, M. Inhibiting CDK6 Activity by Quercetin Is an Attractive Strategy for Cancer Therapy. *ACS Omega* **2020**, *5* (42), 27480–27491.
- (53) Kumar, V.; Guru, S. K.; Jain, S. K.; Joshi, P.; Gandhi, S. G.; Bharate, S. B.; Bhushan, S.; Bharate, S. S.; Vishwakarma, R. A. A Chromatography-Free Isolation of Rohitukine from Leaves of *Dysoxylum Binectariferum*: Evaluation for in Vitro Cytotoxicity, Cdk Inhibition and Physicochemical Properties. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26* (15), 3457–3463.

- (54) Poratti, M.; Marzaro, G. Third-Generation CDK Inhibitors: A Review on the Synthesis and Binding Modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *Eur J Med Chem* **2019**, *172*, 143–153.
- (55) McCain, J. First-in-Class CDK4/6 Inhibitor Palbociclib Could Usher in a New Wave of Combination Therapies for HR+, HER2- Breast Cancer. *P and T* **2015**, *40* (8), 947–956.
- (56) Pinhel, I.; Hills, M.; Drury, S.; Salter, J.; Sumo, G.; A'Hern, R.; Bliss, J. M.; Sestak, I.; Cuzick, J.; Barrett-Lee, P.; Harris, A.; Dowsett, M.; Bliss, M.; Johnson, L.; Lawrence, D.; Price, D.; Peto, J.; Yarnold, J.; Barrett-Lee, P.; Brunt, A. M.; Dodwell, D.; Earl, H.; Fernando, I.; Foster, L.; George, W. D.; Harnett, A. M.; Perren, T.; Poole, C.; Raina, V.; Robinson, A. ER and HER2 Expression Are Positively Correlated in HER2 Non-Overexpressing Breast Cancer. *Breast Cancer Research* **2012**, *14* (2), R46.
- (57) Finn, R. S.; Crown, J. P.; Lang, I.; Boer, K.; Bondarenko, I. M.; Kulyk, S. O.; Ettl, J.; Patel, R.; Pinter, T.; Schmidt, M.; Shparyk, Y.; Thummala, A. R.; Voytko, N. L.; Fowst, C.; Huang, X.; Kim, S. T.; Randolph, S.; Slamon, D. J. The Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Palbociclib in Combination with Letrozole versus Letrozole Alone as First-Line Treatment of Oestrogen Receptor-Positive, HER2-Negative, Advanced Breast Cancer (PALOMA-1/TRIO-18): A Randomised Phase 2 Study. *Lancet Oncol* **2015**, *16* (1), 25–35.
- (58) Sinclair, W. D.; Cui, X. The Effects of HER2 on CDK4/6 Activity in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* **2022**, *22* (3), 278–285.
- (59) Febres-Aldana, C. A.; Chang, J. C.; Ptashkin, R.; Wang, Y.; Gedvilaite, E.; Baine, M. K.; Travis, W. D.; Ventura, K.; Bodd, F.; Yu, H. A.; Quintanal-Villalonga, A.; Lai, W. V.; Egger, J. v.; Offin, M.; Ladanyi, M.; Rudin, C. M.; Rekhman, N. Rb Tumor Suppressor in Small Cell Lung Cancer: Combined Genomic and IHC Analysis with a Description of a Distinct Rb-Proficient Subset. *Clinical Cancer Research* **2022**, *28* (21), 4702–4713.
- (60) Friberg, L. E.; Henningson, A.; Maas, H.; Nguyen, L.; Karlsson, M. O. Model of Chemotherapy-Induced Myelosuppression with Parameter Consistency across Drugs. *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20* (24), 4713–4721.

- (61) Weiss, J. M.; Csoszi, T.; Maglakelidze, M.; Hoyer, R. J.; Beck, J. T.; Domine Gomez, M.; Lowczak, A.; Aljumaily, R.; Rocha Lima, C. M.; Boccia, R. v.; Hanna, W.; Nikolinakos, P.; Chiu, V. K.; Owonikoko, T. K.; Schuster, S. R.; Hussein, M. A.; Richards, D. A.; Sawrycki, P.; Bulat, I.; Hamm, J. T.; Hart, L. L.; Adler, S.; Antal, J. M.; Lai, A. Y.; Sorrentino, J. A.; Yang, Z.; Malik, R. K.; Morris, S. R.; Roberts, P. J.; Dragnev, K. H. Myelopreservation with the CDK4/6 Inhibitor Trilaciclib in Patients with Small-Cell Lung Cancer Receiving First-Line Chemotherapy: A Phase Ib/Randomized Phase II Trial. *Annals of Oncology* **2019**, *30* (10), 1613–1621.
- (62) Dómine Gómez, M.; Csőszi, T.; Jaal, J.; Kudaba, I.; Nikolov, K.; Radosavljevic, D.; Xiao, J.; Horton, J. K.; Malik, R. K.; Subramanian, J. Exploratory Composite Endpoint Demonstrates Benefit of Trilaciclib across Multiple Clinically Meaningful Components of Myeloprotection in Patients with Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer* **2021**, *149* (7), 1463–1472.
- (63) Daniel, D.; Kuchava, V.; Bondarenko, I.; Ivashchuk, O.; Reddy, S.; Jaal, J.; Kudaba, I.; Hart, L.; Matitashvili, A.; Pritchett, Y.; Morris, S. R.; Sorrentino, J. A.; Antal, J. M.; Goldschmidt, J. Trilaciclib Prior to Chemotherapy and Atezolizumab in Patients with Newly Diagnosed Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Trial. *Int J Cancer* **2021**, *148* (10), 2557–2570.
- (64) Daver, N.; Richard, •; Schlenk, F.; Russell, N. H.; Levis, M. J. Targeting FLT3 Mutations in AML: Review of Current Knowledge and Evidence. *Leukemia* **2019**, *33*, 299–312.
- (65) Keegan, K.; Li, C.; Li, Z.; Ma, J.; Ragains, M.; Coberly, S.; Hollenback, D.; Eksterowicz, J.; Liang, L.; Weidner, M.; Huard, J.; Wang, X.; Alba, G.; Orf, J.; Lo, M. C.; Zhao, S.; Ngo, R.; Chen, A.; Liu, L.; Carlson, T.; Quéva, C.; McGee, L. R.; Medina, J.; Kamb, A.; Wickramasinghe, D.; Dai, K. Preclinical Evaluation of AMG 925, a FLT3/CDK4 Dual Kinase Inhibitor for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13* (4), 880–889.
- (66) Anil S. Guram; Roger A. Rennels; Stephen L. Buchwald. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines. *Angewandte Chemie. International Edition* **1995**, *34* (12), 1348–1350.

- (67) Louie, J.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed Synthesis of Arylamines from Aryl Halides. Mechanistic Studies Lead to Coupling in the Absence of Tin Reagents. *Tetrahedron Lett* **1995**, *36* (21), 3609–3612.
- (68) Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Triflates. *J Org Chem* **1997**, *62* (5), 1264–1267.
- (69) Hamann, B. C.; Hartwig, J. F. Sterically Hindered Chelating Alkyl Phosphines Provide Large Rate Accelerations In Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Iodides, Bromides, and Chlorides, and the First Amination of Aryl Tosylates. *J Am Chem Soc* **1998**, *120* (29), 7369–7370.
- (70) Inoue, F.; Kashihara, M.; Yadav, M. R.; Nakao, Y. Buchwald–Hartwig Amination of Nitroarenes. *Angewandte Chemie - International Edition* **2017**, *56* (43), 13307–13309.
- (71) Dorel, R.; Grugel, C. P.; Haydl, A. M. The Buchwald–Hartwig Amination After 25 Years. *Angewandte Chemie - International Edition* **2019**, *58* (48), 17118–17129.
- (72) Al-Amin, M.; Honma, T.; Hoshiya, N.; Shuto, S.; Arisawa, M. Ligand-Free Buchwald–Hartwig Aromatic Aminations of Aryl Halides Catalyzed by Low-Leaching and Highly Recyclable Sulfur-Modified Gold-Supported Palladium Material. *Adv Synth Catal* **2012**, *354* (6), 1061–1068.
- (73) Christmann, U.; Vilar, R. Monoligated Palladium Species as Catalysts in Cross-Coupling Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, *44* (3), 366–374.
- (74) Engle, K. M.; Yu, J. Q. Developing Ligands for Palladium(II)-Catalyzed C-H Functionalization: Intimate Dialogue between Ligand and Substrate. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78* (18), 8927–8955.
- (75) Viciu, M. S.; Grasa, G. A.; Nolan, S. P. Catalytic Dehalogenation of Aryl Halides Mediated by a Palladium/Imidazolium Salt System. *Organometallics* **2001**, *20* (16), 3607–3612.
- (76) Surry, D. S.; Buchwald, S. L. Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination. *Angewandte Chemie - International Edition* **2008**, *47* (34), 6338–6361.

- (77) Laffoon, J. D.; Chan, V. S.; Fickes, M. G.; Kotecki, B.; Ickes, A. R.; Henle, J.; Napolitano, J. G.; Franczyk, T. S.; Dunn, T. B.; Barnes, D. M.; Haight, A. R.; Henry, R. F.; Shekhar, S. Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reactions Promoted by Biaryl Phosphorinane Ligands. *ACS Catal* **2019**, *9* (12), 11691–11708.
- (78) Wolfe, J. P.; Buchwald, S. L. Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Iodides. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (3), 1133–1135.
- (79) Ullmann, F. Ueber Symmetrische Biphenyl-derivate. *Justus Liebigs Ann Chem* **1904**, *322* (1–2), 38–81.
- (80) Ullman, F.; Bielecki, J. Ueber Synthesen in Der Biphenylreihe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34* (2), 2174–2185.
- (81) Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L. Applications of Palladium-Catalyzed C-N Cross-Coupling Reactions. *Chemical Reviews*. American Chemical Society October 12, 2016, pp 12564–12649.
- (82) Trowse, B. R.; Byrne, F. P.; Sherwood, J.; O'Brien, P.; Murray, J.; Farmer, T. J. 2,2,5,5-Tetramethyloxolane (TMO) as a Solvent for Buchwald-Hartwig Aminations. *ACS Sustain Chem Eng* **2021**, *9* (51), 17330–17337.
- (83) Lei, P.; Wang, Y.; Mu, Y.; Wang, Y.; Ma, Z.; Feng, J.; Liu, X.; Szostak, M. Green-Solvent Selection for Acyl Buchwald-Hartwig Cross-Coupling of Amides (Transamidation). *ACS Sustain Chem Eng* **2021**, *9* (44), 14937–14945.
- (84) Jordan, A.; Hall, C. G. J.; Thorp, L. R.; Sneddon, H. F. Replacement of Less-Preferred Dipolar Aprotic and Ethereal Solvents in Synthetic Organic Chemistry with More Sustainable Alternatives. *Chemical Reviews*. American Chemical Society March 23, 2022, pp 6749–6794.
- (85) Wilson, K. L.; Murray, J.; Sneddon, H. F.; Jamieson, C.; Watson, A. J. B. Dimethylisobornide (DMI) as a Bio-Derived Solvent for Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Synlett* **2018**, *29* (17), 2293–2297.

- (86) Mouret, A.; Leclercq, L.; Mühlbauer, A.; Nardello-Rataj, V. Eco-Friendly Solvents and Amphiphilic Catalytic Polyoxometalate Nanoparticles: A Winning Combination for Olefin Epoxidation. *Green Chemistry* **2014**, *16* (1), 269–278.
- (87) Lipshutz, B. H.; Ghorai, S.; Abela, A. R.; Moser, R.; Nishikata, T.; Duplais, C.; Krasovskiy, A.; Gaston, R. D.; Gadwood, R. C. TPGS-750-M: A Second-Generation Amphiphile for Metal-Catalyzed Cross-Couplings in Water at Room Temperature. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (11), 4379–4391.
- (88) Salomé, C.; Wagner, P.; Bollenbach, M.; Bihel, F.; Bourguignon, J. J.; Schmitt, M. Buchwald-Hartwig Reactions in Water Using Surfactants. *Tetrahedron* **2014**, *70* (21), 3413–3421.
- (89) Crawford, J. J.; Johnson, A. R.; Misner, D. L.; Belmont, L. D.; Castanedo, G.; Choy, R.; Coraggio, M.; Dong, L.; Eigenbrot, C.; Erickson, R.; Ghilardi, N.; Hau, J.; Katewa, A.; Kohli, P. B.; Lee, W.; Lubach, J. W.; McKenzie, B. S.; Ortwine, D. F.; Schutt, L.; Tay, S.; Wei, B.; Reif, K.; Liu, L.; Wong, H.; Young, W. B. Discovery of GDC-0853: A Potent, Selective, and Noncovalent Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor in Early Clinical Development. *J Med Chem* **2018**, *61* (6), 2227–2245.
- (90) Zhang, H.; Cravillion, T.; Lim, N. K.; Tian, Q.; Beaudry, D.; Defreese, J. L.; Fettes, A.; James, P.; Linder, D.; Malhotra, S.; Han, C.; Angelaud, R.; Gosselin, F. Development of an Efficient Manufacturing Process for Reversible Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor GDC-0853. *Org Process Res Dev* **2018**, *22* (8), 978–990.
- (91) Mari, M.; Bartoccini, F.; Piersanti, G. Synthesis of (-)-Epi-Indolactam v by an Intramolecular Buchwald-Hartwig C-N Coupling Cyclization Reaction. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78* (15), 7727–7734.
- (92) Mosrin, M.; Knochel, P. Regio- And Chemoselective Metalation of Chloropyrimidine Derivatives with $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ and $\text{TMP}_2\text{Zn}\cdot 2\text{MgCl}_2\cdot 2\text{LiCl}$. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (6), 1468–1477.
- (93) Nagata, T.; Masuda, K.; Maeno, S.; Miura, I. Synthesis and Structure-Activity Study of Fungicidal Anilinopyrimidines Leading to Mepanipyrim (KIF-3535) as an Anti-Botrytis Agent. *Pest Manag Sci* **2004**, *60* (4), 399–407.

- (94) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids*. 2018, pp 39–68.
- (95) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
- (96) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J Comb Chem* **1999**, *1* (1), 55–68.
- (97) Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* **2012**, *1* (69).
- (98) Zhang, L.; Wang, X. jun; Wang, J.; Grinberg, N.; Krishnamurthy, D. K.; Senanayake, C. H. An Improved Method of Amide Synthesis Using Acyl Chlorides. *Tetrahedron Lett* **2009**, *50* (24), 2964–2966.
- (99) Baumann, E. Ueber Eine Einfache Methode Der Darstellung von Benzoësäureäthern. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1886**, *19* (2), 3218–3222.
- (100) Schotten, C. Ueber Die Oxydation Des Piperidins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1883**, *17* (2), 2544–2547.
- (101) Ansell, M. F. Preparation of Acyl Halides. In *Patai Chemistry of Functional Groups Chemistry of Acyl Halides*; 2010; Vol. 3, pp 35–68.
- (102) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem Rev* **2011**, *111* (11), 6557–6602.
- (103) Wang, Y.; Zhang, W. X.; Xi, Z. Carbodiimide-Based Synthesis of N-Heterocycles: Moving from Two Classical Reactive Sites to Chemical Bond Breaking/Forming Reaction. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (16), 5810–5849.
- (104) Williams, A.; Ibrahim, I. T. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem Rev* **1981**, *81* (6), 589–636.

- (105) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J Am Chem Soc* **1955**, *77* (4), 1067–1068.
- (106) König, W.; Geiger, R. Eine Neue Methode Zur Synthese von Peptiden: Aktivierung Der Carboxylgruppe Mit Dicyclohexylcarbodiimid Unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem Ber* **1970**, *103* (3), 788–798.
- (107) Magano, J. Large-Scale Amidations in Process Chemistry: Practical Considerations for Reagent Selection and Reaction Execution. *Org Process Res Dev* **2022**, *26* (6), 1562–1689.
- (108) Gibson, F. S.; Park, M. S.; Rapoport, H. Bis[[4-(2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolyl)]Methyl]-Carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59* (24), 7503–7507.
- (109) Camanni, F.; Ghigo, E.; Arvat, E. Growth Hormone-Releasing Peptides and Their Analogs. *Front Neuroendocrinol* **1998**, *19* (1), 47–72.
- (110) Zheng, N.; Armstrong, J. D.; Eng, K. K.; Keller, J.; Liu, T.; Purick, R.; Lynch, J.; Hartner, F. W.; Volante, R. P. A Convergent Asymmetric Synthesis of a Growth Hormone Secretagogue. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (22), 3435–3446.
- (111) Bingham, B.; Jones, P. G.; Uveges, A. J.; Kotnis, S.; Lu, P.; Smith, V. A.; Sun, S. C.; Resnick, L.; Chlenov, M.; He, Y.; Strassle, B. W.; Cummons, T. A.; Piesla, M. J.; Harrison, J. E.; Whiteside, G. T.; Kennedy, J. D. Species-Specific in Vitro Pharmacological Effects of the Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Selective Ligand AM1241 and Its Resolved Enantiomers. *Br J Pharmacol* **2007**, *151* (7), 1061–1070.
- (112) Kotagiri, V. K.; Suthrapu, S.; Reddy, J. M.; Rao, C. P.; Bollugoddu, V.; Bhattacharya, A.; Bandichhor, R. An Improved Synthesis of Rimonabant: Anti-Obesity Drug. *Org Process Res Dev* **2007**, *11* (5), 910–912.
- (113) Yoshioka, T.; Fulita, T.; Kanai, T.; Aizawa, Y.; Kurumada, T.; Horikoshi, H.; Hasegawa, K. Studies on Hindered Phenols and Analogues. 1. Hypolipidemic and Hypoglycemic Agents with Ability to Inhibit Lipid Peroxidation. *J Med Chem* **1989**, *32* (2), 421–428.

- (114) Sam, A. H.; Salem, V.; Ghatei, M. A. Rimonabant: From RIO to Ban. *J Obes* **2011**, No. 432607.
- (115) Vandenberg, R. J. B. H. N.; Vanrijssel, E. R.; Ferraz, M. J.; Houben, J.; Strijland, A.; Donker-Koopman, W. E.; Wennekes, T.; Bongers, K. M.; Ghisaidoobe, A. B. T.; Hoogendoorn, S.; Vandermaarel, G. A.; Codée, J. D. C.; Overkleeft, H. S.; Aerts, J. M. F. G. Synthesis and Evaluation of Hybrid Structures Composed of Two Glucosylceramide Synthase Inhibitors. *ChemMedChem* **2015**, *10* (12), 2042–2062.
- (116) Bradford H. et. al. Synthesis of Udp-Glucose: N-Acylsphingosine Glucosyltransferase Inhibitors, 2003.
- (117) Poole, R. M. Eliglustat: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74* (15), 1829–1836.
- (118) Bennett, L. L.; Turcotte, K. Eliglustat Tartrate for the Treatment of Adults with Type 1 Gaucher Disease. *Drug Des Devel Ther* **2015**, *2015* (9), 4639–4647.
- (119) Sun, G.; Jian, W.; Luo, Z.; Sun, T.; Li, C.; Zhang, J.; Wang, Z. Development of an Efficient and Scalable Asymmetric Synthesis of Eliglustat via Ruthenium(II)-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation. *Org Process Res Dev* **2019**, *23* (6), 1204–1212.
- (120) Manne, S. R.; Sharma, A.; Sazonovas, A.; El-Faham, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Understanding OxymaPure as a Peptide Coupling Additive: A Guide to New Oxyma Derivatives. *ACS Omega* **2022**, *7* (7), 6007–6023.
- (121) Steklov, M. Y.; Tararov, V. I.; Romanov, G. A.; Mikhailov, S. N. Facile Synthesis of 8-Azido-6-Benzylaminopurine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30* (7–8), 503–511.
- (122) Ren, F.; Zhang, Y.; Hu, L.; Luo, M. Reduction of Hydrazines to Amines with Low-Valent Titanium Reagent. *Arkivoc* **2013**, *2013* (3), 165–173.
- (123) Affouard, C.; Crockett, R. D.; Diker, K.; Farrell, R. P.; Gorins, G.; Huckins, J. R.; Caille, S. Multi-Kilo Delivery of AMG 925 Featuring a Buchwald-Hartwig Amination and Processing with Insoluble Synthetic Intermediates. *Org Process Res Dev* **2015**, *19* (3), 476–485.

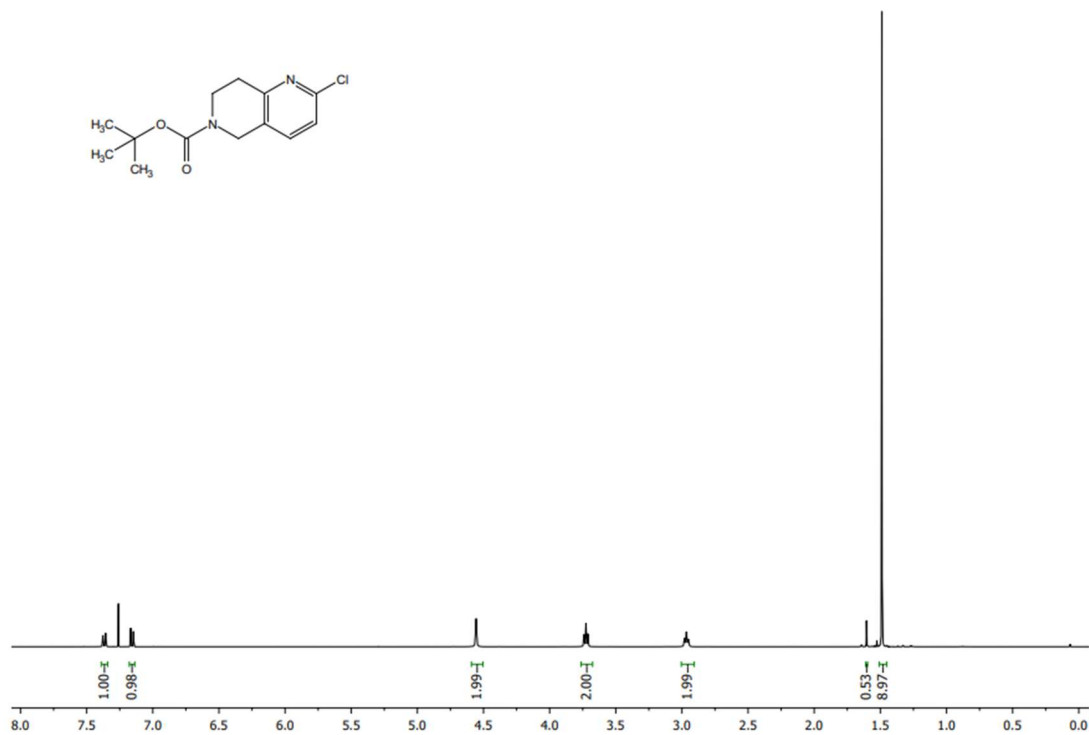
8 PŘEHLED SCHÉMAT, OBRÁZKŮ, TABULEK A SPEKTER

Obrázek 1: Obecná struktura proteinové kinázy (PDB kód: 1ATP) ¹⁴	18
Obrázek 2: Detail vazebného místa pro ATP (PDB kód: 1ATP) ¹⁴ ; (b) strukturní vzorec ATP. ¹⁴	19
Obrázek 3: Přírodní anticytokininy (ANCYT1-3) a cytokinin trans-Zeatin.....	23
Obrázek 4: Přírodní izolát – Staurosporin.	24
Obrázek 5: První syntetické inhibitory CDK – Olomoucín 1,2 a R-Roscovitin.....	25
Obrázek 6: Flavonidové inhibitory CDK – Flavopiridol, Rohitukin a Quercetin.	25
Obrázek 7: Duální inhibitory CDK – Palbociclib.....	26
Obrázek 8: Duální inhibitory CDK – Trilaciclib.	27
Obrázek 9: Duální inhibitory CDK – AMG 925.	28
Obrázek 10: Příklady Buchwaldových ligandů.	30
Obrázek 11: Aprotická rozpouštědla použitelná při couplingových reakcích rozdělena dle šetrnosti k životnímu prostředí.	31
Obrázek 12: Surfaktant TPGS-750-M.	32
Obrázek 13: Příklady komerčně používaných karbodiimidů.	37
Obrázek 14: Příklady aditiv pro karboxyl-aminovou kondenzaci.	39
Obrázek 15: Komplexy Pd(OAc) ₂ dppf a BrettPhos Pd G3 použité v syntéze IX	52
Obrázek 16: Struktury látek zaslaných na biologickou aktivitu, včetně výchozí PCC14-NM-4E	64
Schéma 1: Znázornění myšlenkového postupu využitého při návrhu cílové látky I . ^{2,4}	15
Schéma 2: Vliv CDK na regulaci buněčného cyklu.	16
Schéma 3: Obecný mechanismus Buchwald-Hartwigovy aminace.	29
Schéma 4: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze BTK inhibitoru GDC-0853. ⁹⁰ 33	
Schéma 5: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze Indolaktamu V	34
Schéma 6: Využití Buchwald-Hartwigovy reakce při syntéze fungicidu Mepaniprymu.	34
Schéma 7: Obecné schéma syntézy amidu.	35
Schéma 8: Mechanismus použití DIC a OxymyPure při syntéze amidu.	36
Schéma 9: Možné reakční cesty <i>O</i> -acylisomočoviny.	38
Schéma 10: Příklad využití systému DCC a HOBt při přípravě GHS.....	40
Schéma 11: Využití systému DCC a HOBt při přípravě inhibitoru kanabidiolového receptoru, Rimonabantu 1	41
Schéma 12: Příprava intermediátu 23 využitého při syntéze Eliglustatu 1	42
Schéma 13: Design cílové látky I	43

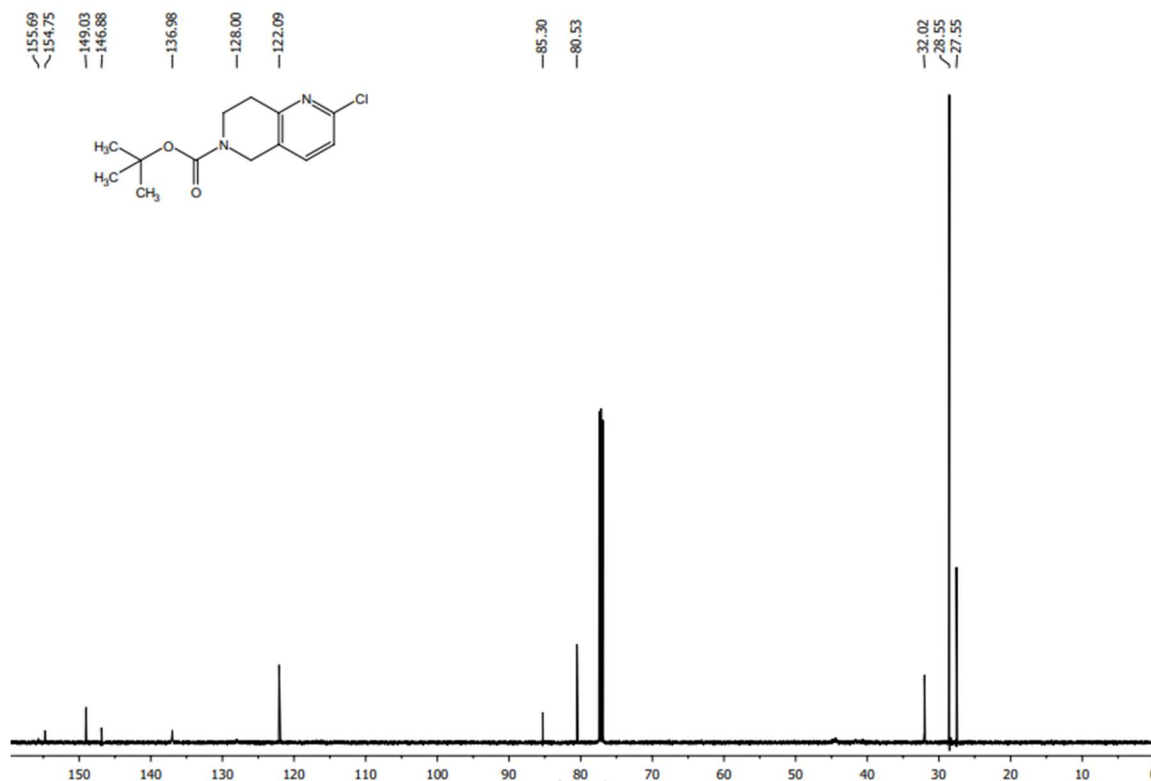
Schéma 14: Struktury navržených látek II a III jako analoga cílové látky I	44
Schéma 15: Retrosyntéza přípravy I	45
Schéma 16: Přímá syntéza inhibitoru I	47
Schéma 17: Obecný reakční mechanismus titanem moderované deaminace hydrazinu.....	49
Schéma 18: Přímá syntéza derivátu II pomocí karboxyl-aminové kondenzace X s <i>N,N</i> -dimethylglycinem.	52
Schéma 19: Přímá syntéza II pomocí BH aminace z modifikovaného ligandu XIII	53
Tabulka 1: Optimalizace B-H aminace.....	50
Tabulka 2: Optimalizace alifatické S _N ²	53
Tabulka 3: Výsledky biologické aktivity vybraných látek.	64

9 PŘÍLOHY – NMR SPEKTRA

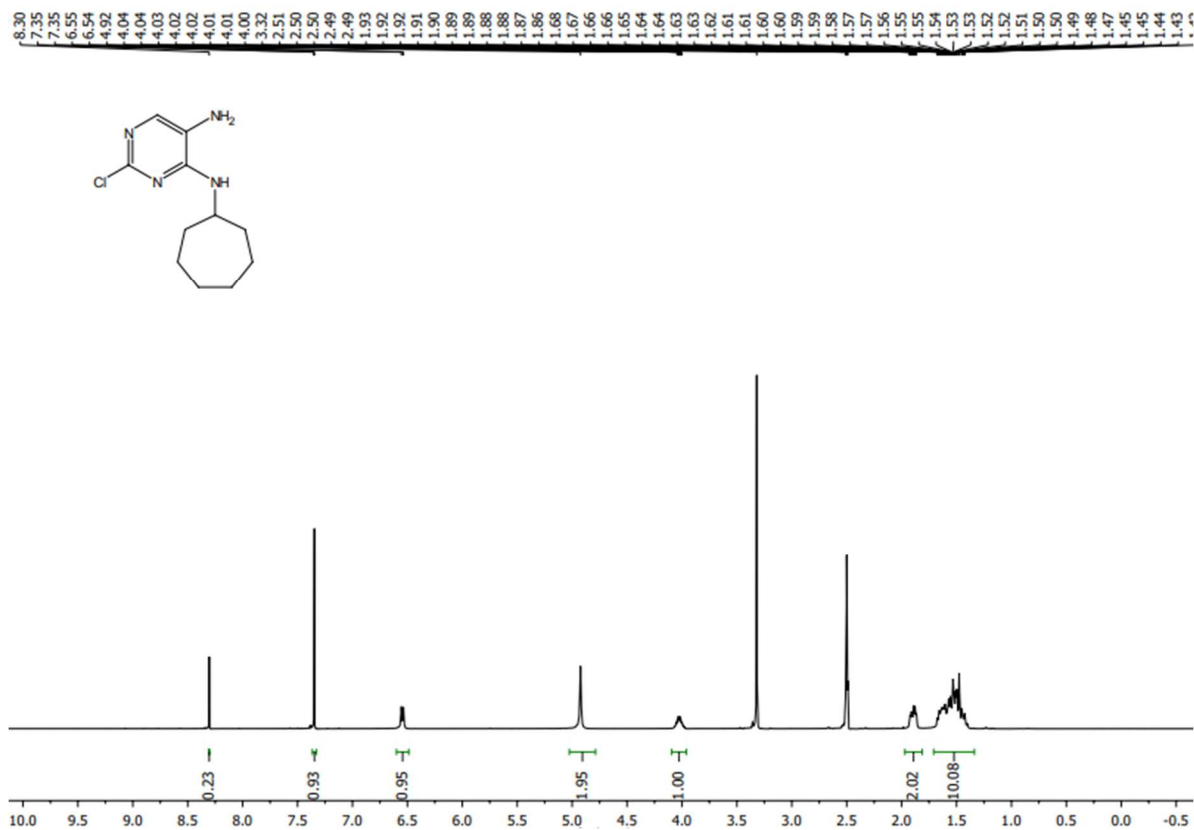
Spektrum 1: ^1H NMR *tert*-buthyl 2-chloro-7,8-dihydro-1,6-naphthyridin-6(5*H*)-karboxylátu (XII) v CDCl_3



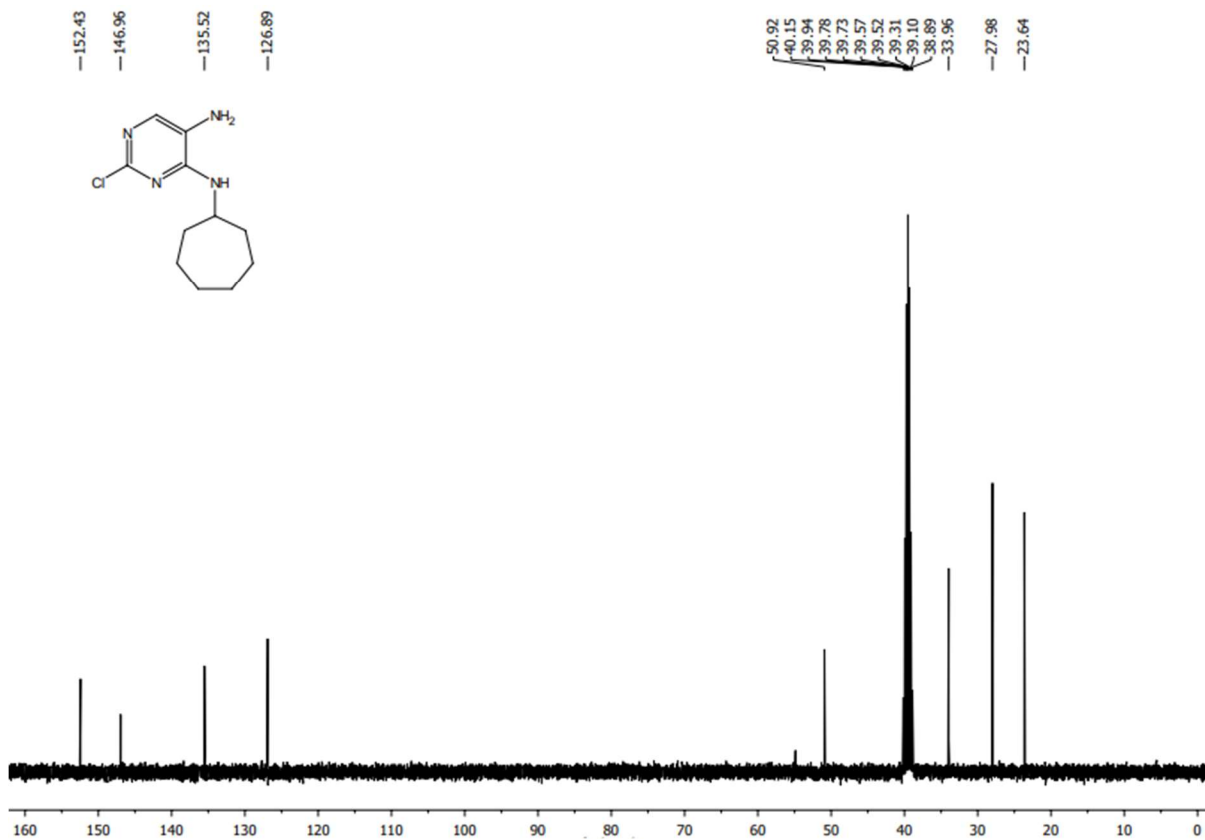
Spektrum 2: ^{13}C NMR *tert*-buthyl 2-chloro-7,8-dihydro-1,6-naphthyridin-6(5*H*)-karboxylátu (XII) v CDCl_3



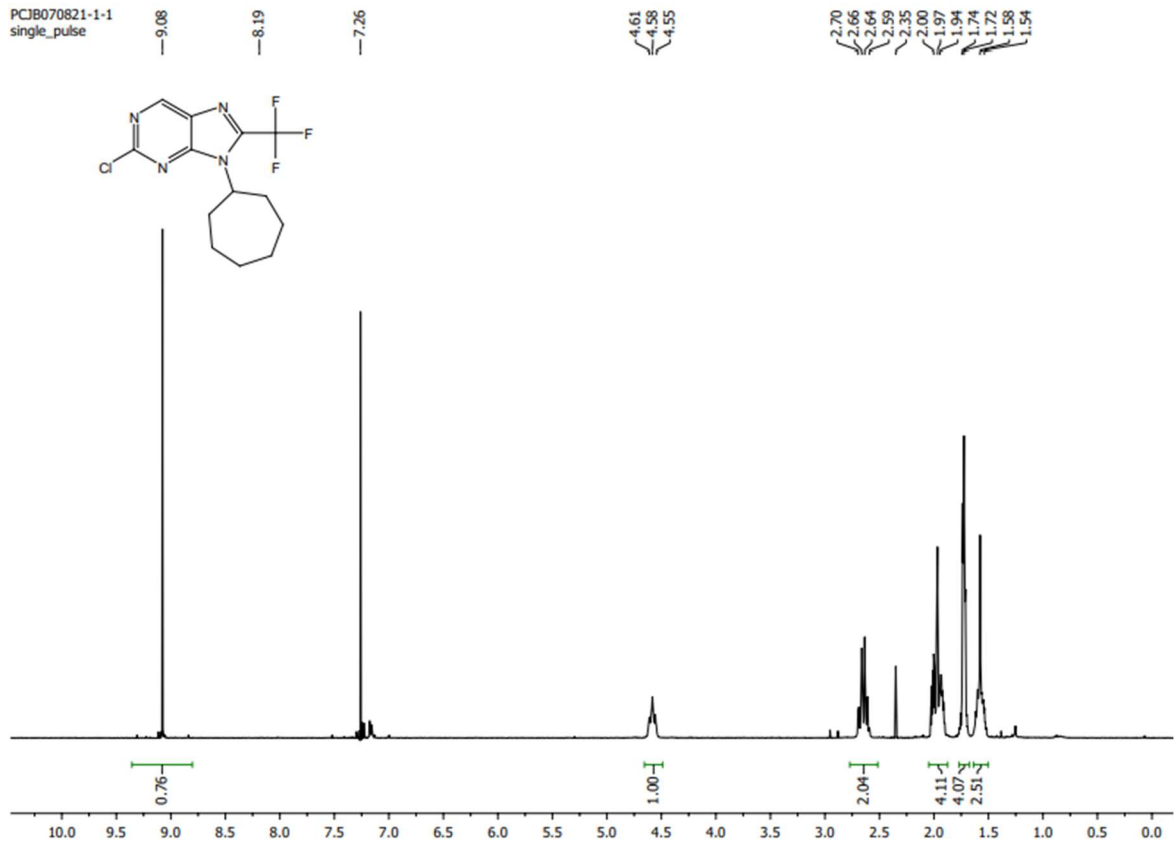
Spektrum 3: ^1H NMR 2-chlor-*N*^t-cykloheptylpyrimidin-4,5-diaminu (V) v $\text{DMSO}-d_6$



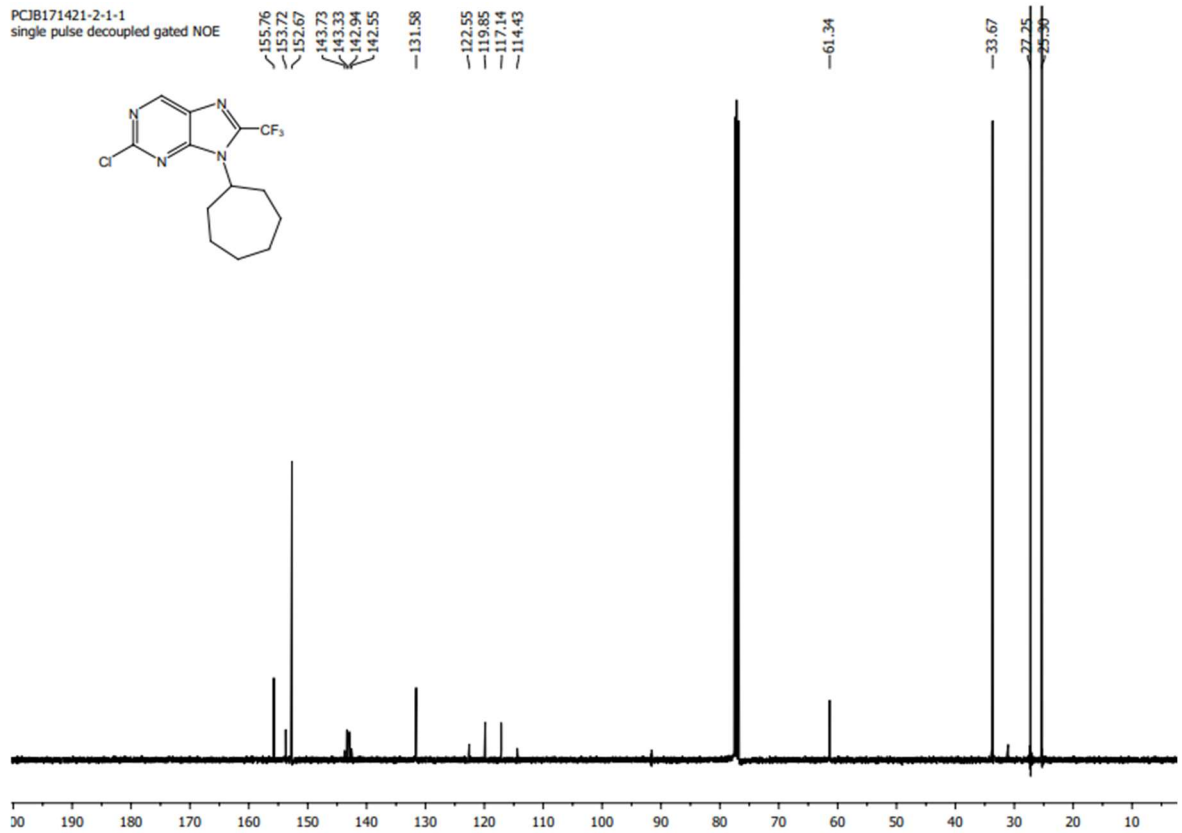
Spektrum 4: ¹³C NMR 2-chlor-N⁴-cykloheptylpyrimidin-4,5-diaminu (V) v DMSO-*d*₆



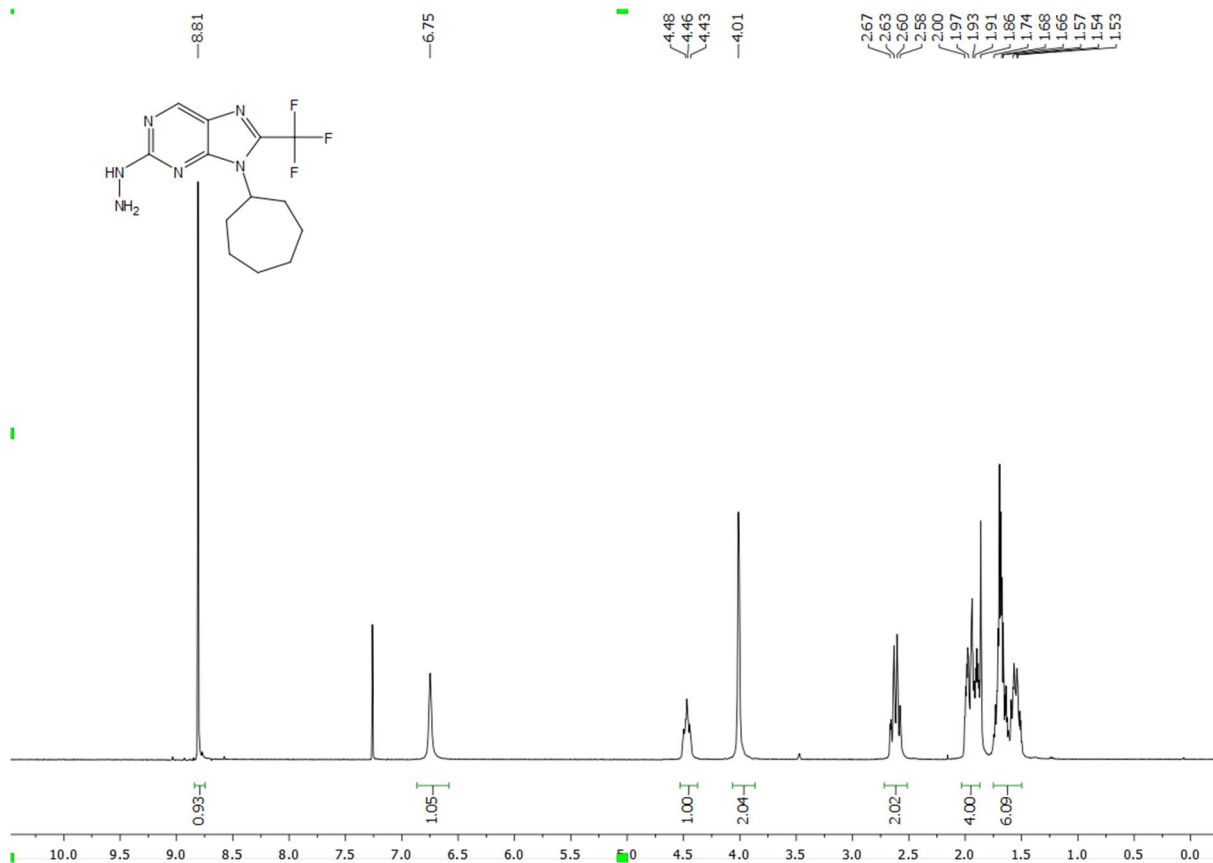
Spektrum 5: ¹H NMR 2-chlor-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purinu (VI) v DMSO-*d*₆



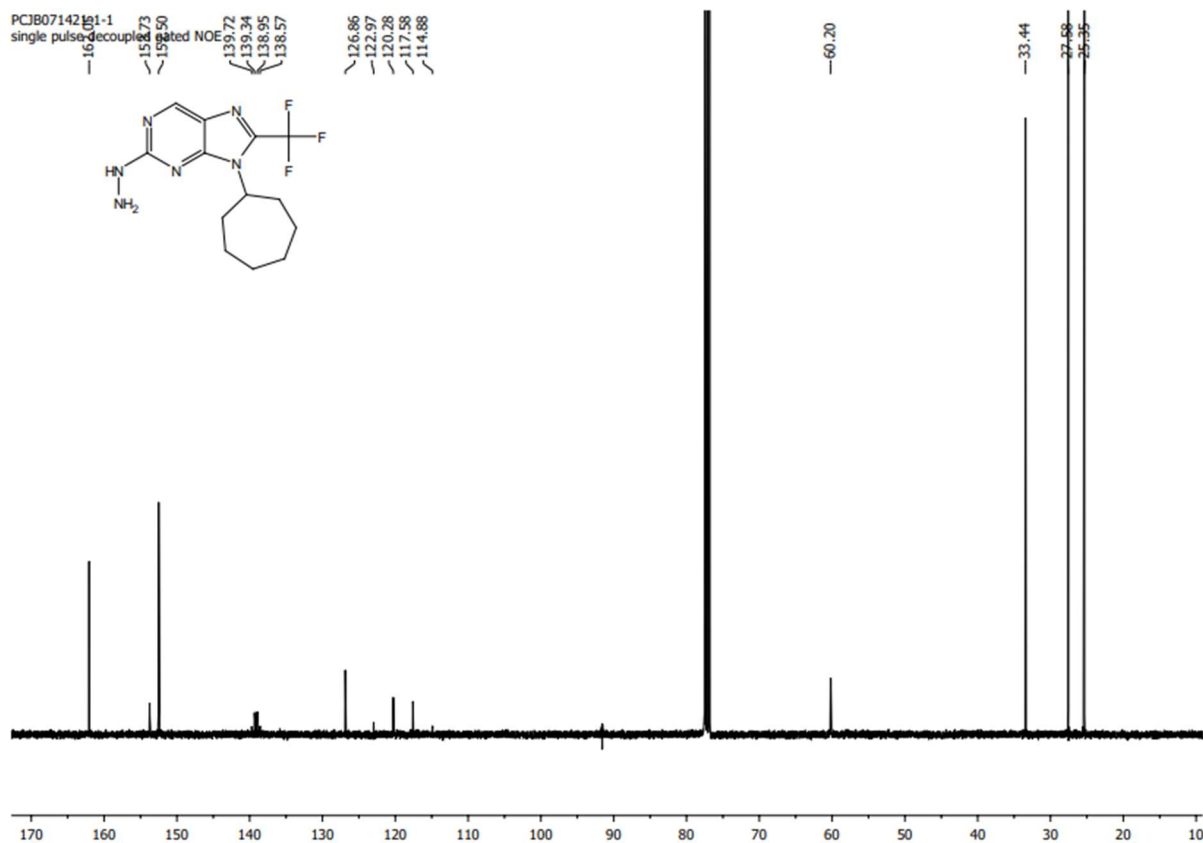
Spektrum 6: ^{13}C NMR 2-chlor-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purinu (VI) v DMSO- d_6



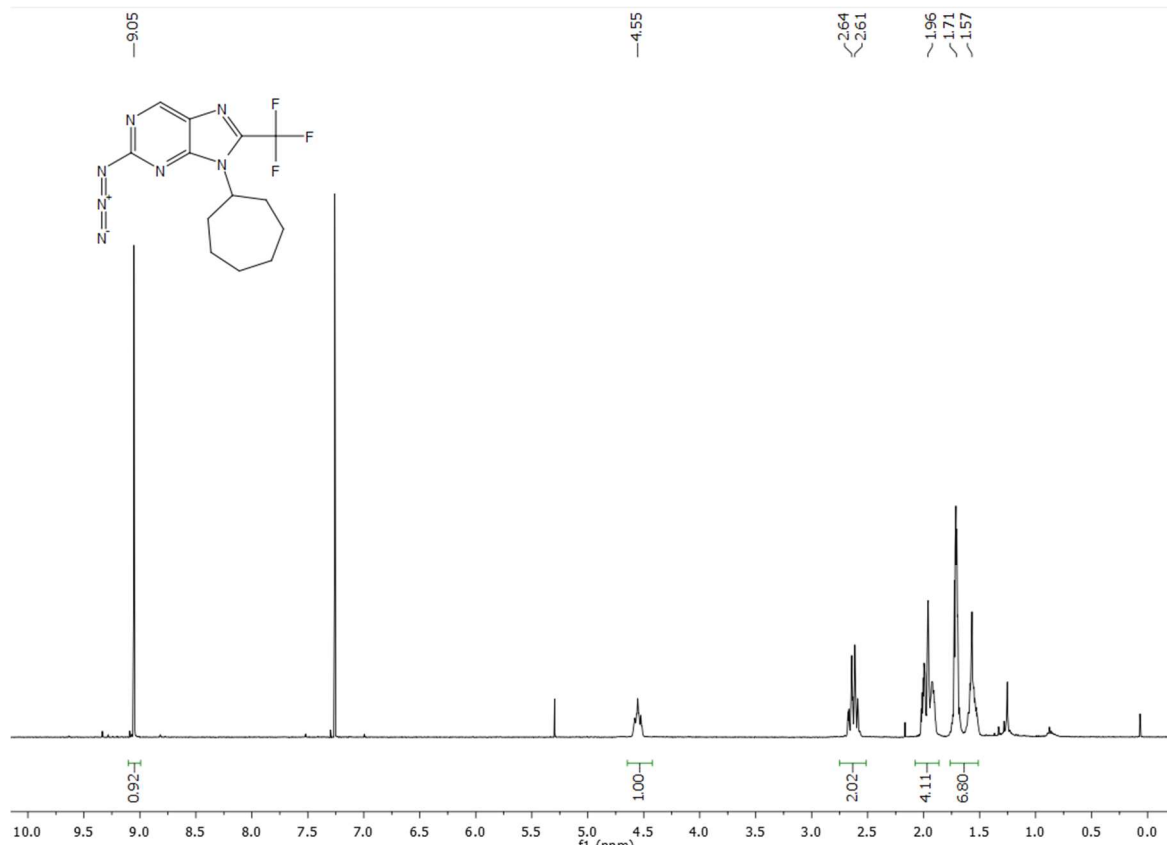
Spektrum 7: ^1H NMR 9-cykloheptyl-2-hydrazinyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purinu (VII) v CDCl_3



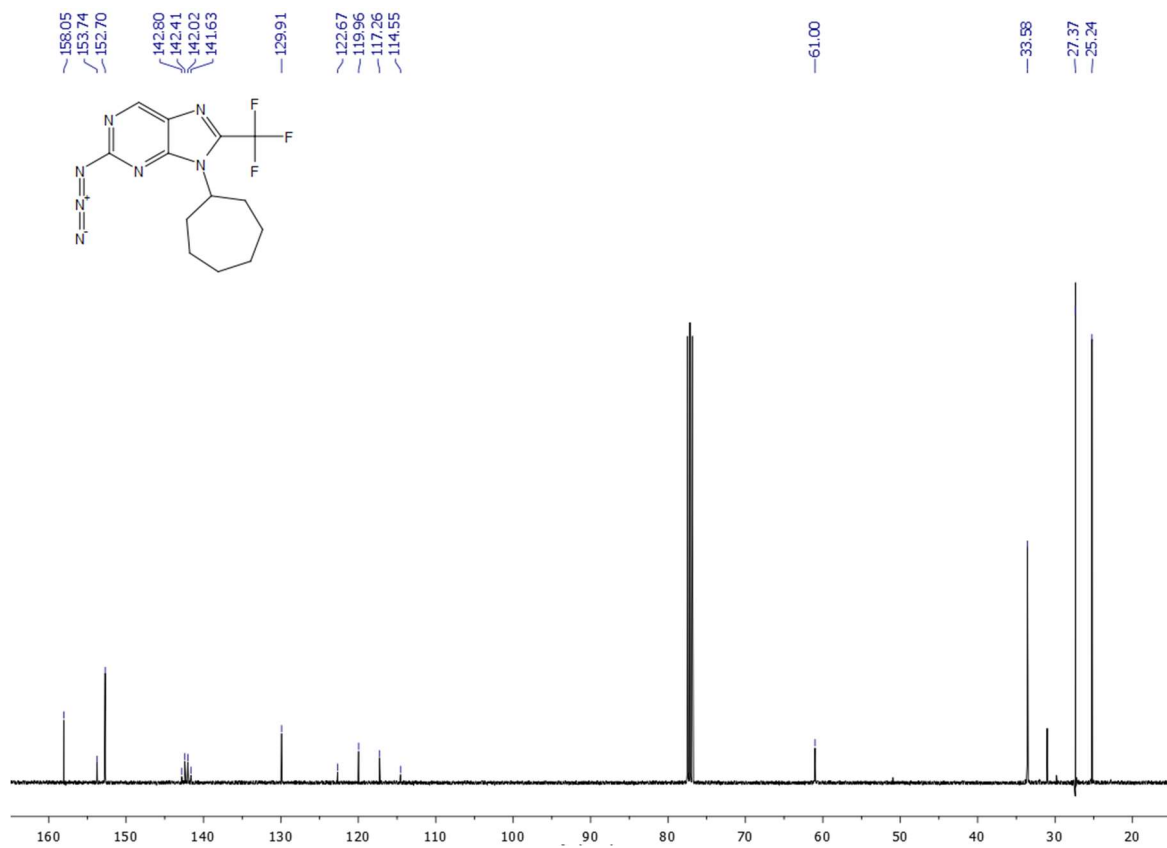
Spektrum 8: ^{13}C NMR 9-cykloheptyl-2-hydrazinyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purinu (VII) v CDCl_3



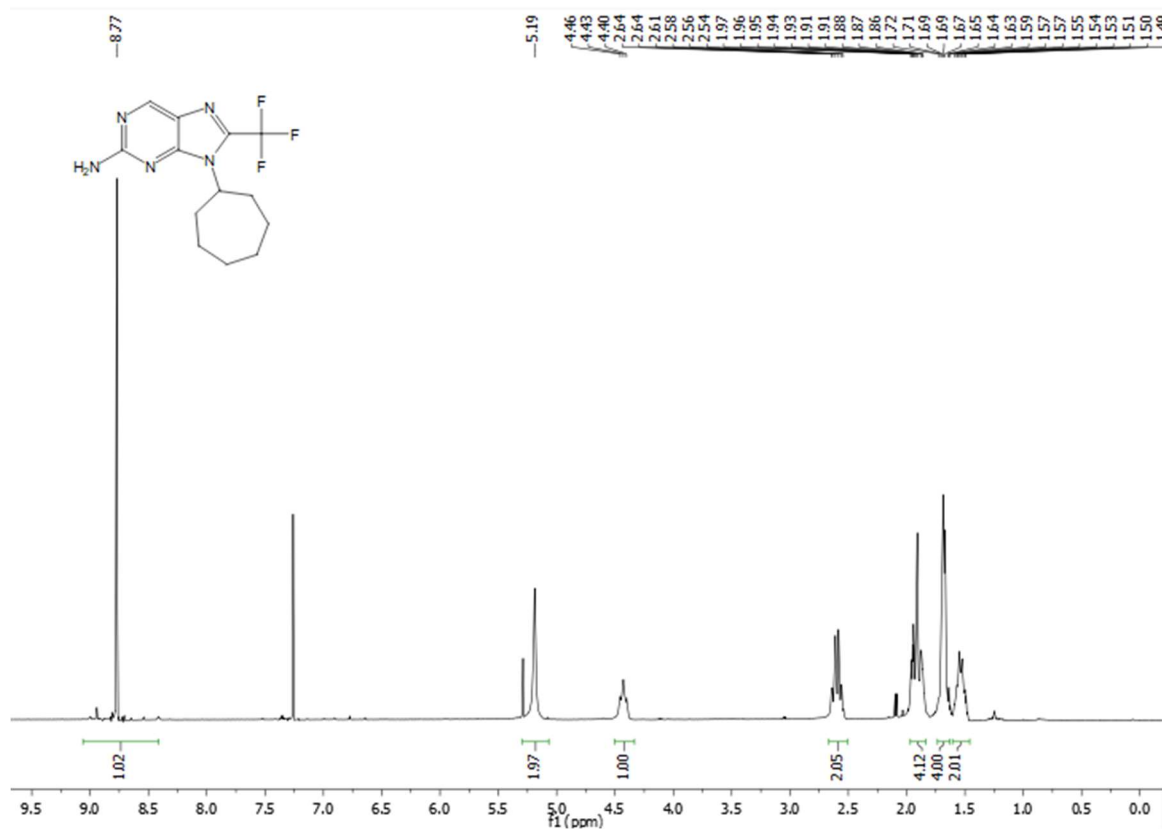
Spektrum 9: ^1H NMR 2-azido-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9*H*-purin (XV) v CDCl_3



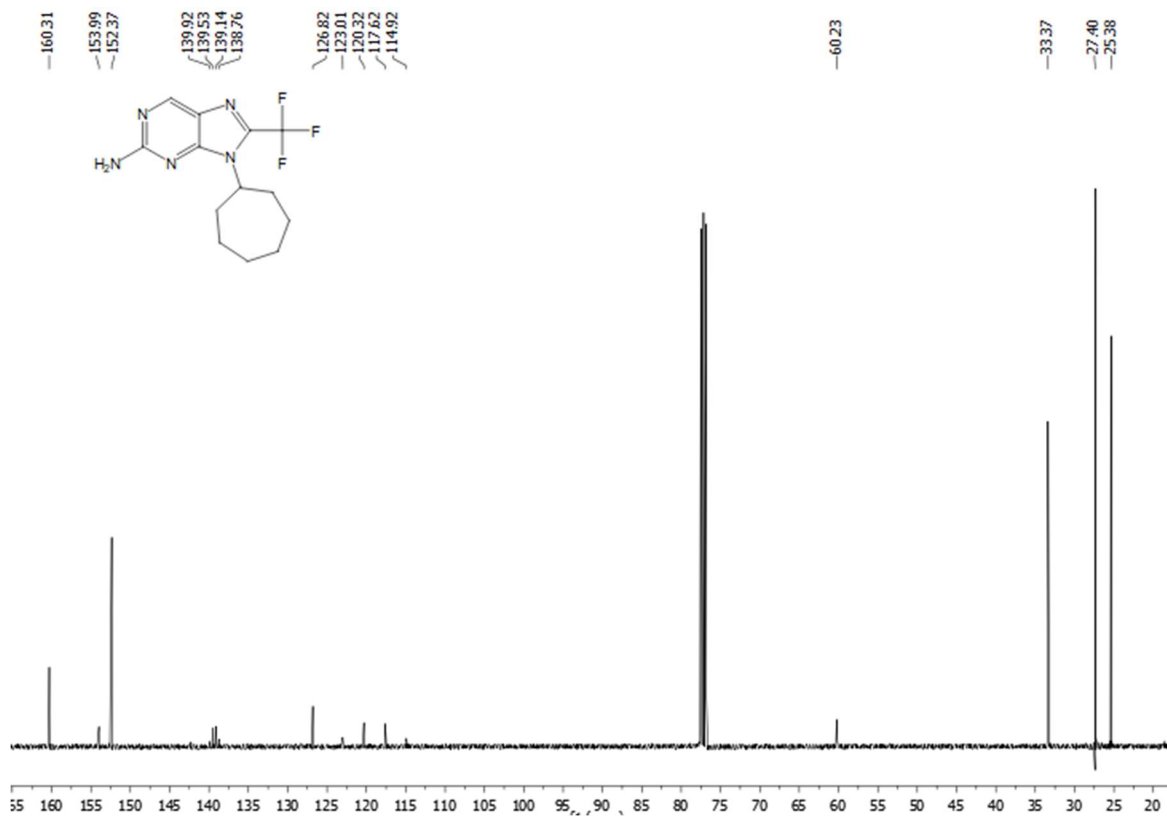
Spektrum 10: ^{13}C NMR 2-azido-9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9*H*-purin (XV) v CDCl_3



Spektrum 11: ^1H NMR 9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purin-2-amiu (**VIII**) v CDCl_3

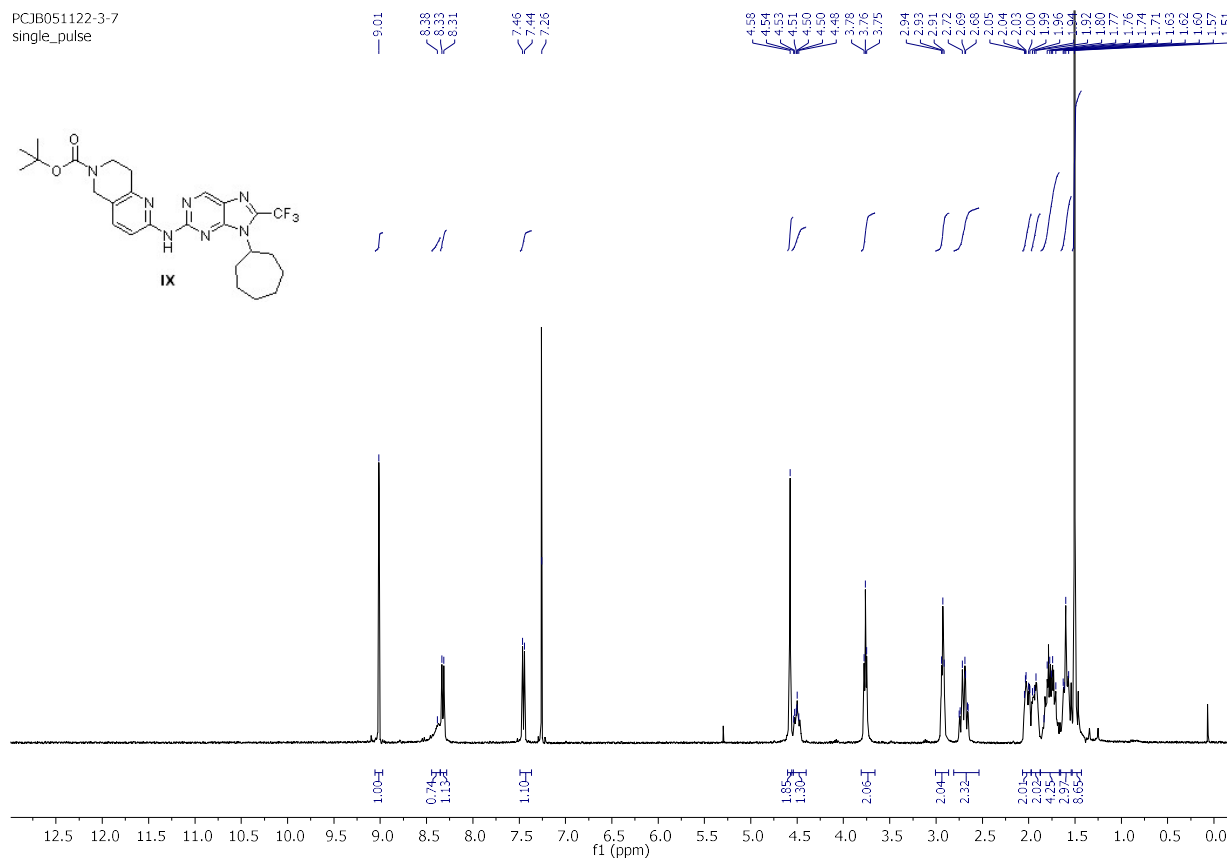


Spektrum 12: ^{13}C NMR 9-cykloheptyl-8-(trifluormethyl)-9H-purin-2-amiu (**VIII**) v CDCl_3



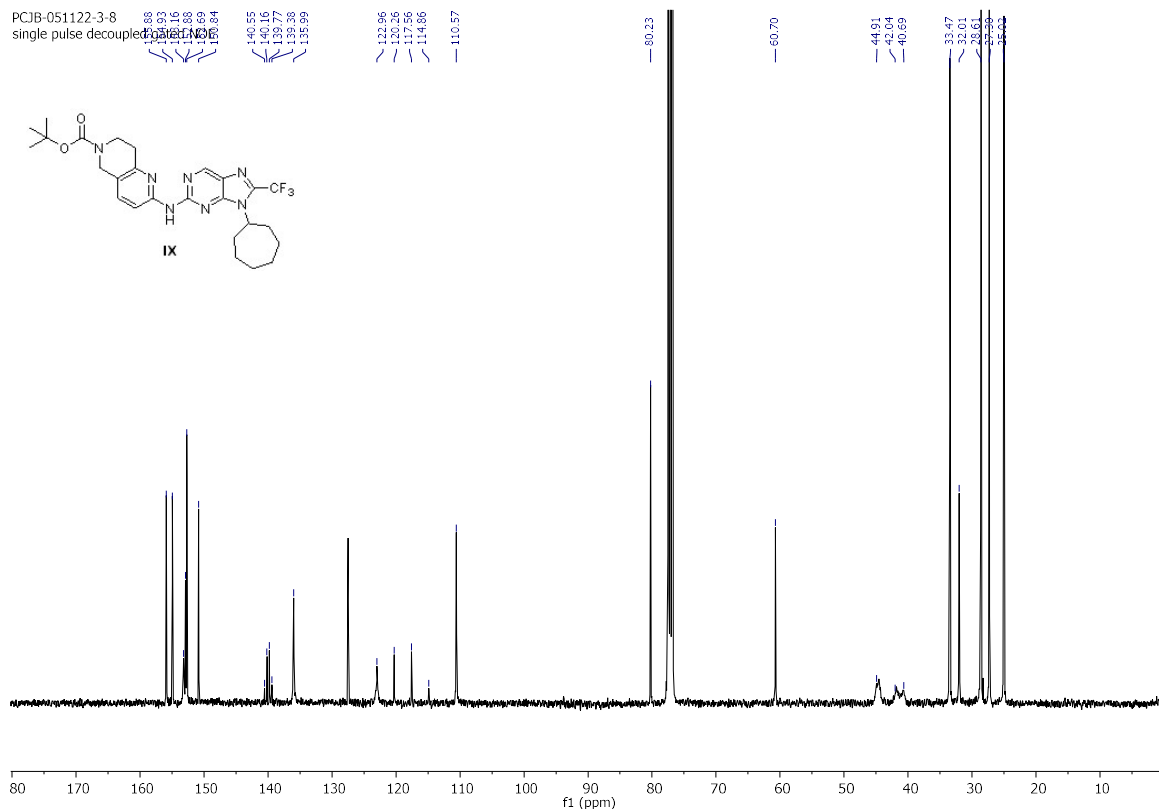
Spektrum 13: ^1H NMR *tert*-butyl 2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftiridin-6(5*H*)-karboxylátu (IX) v CDCl_3

PCJB051122-3-7
single_pulse

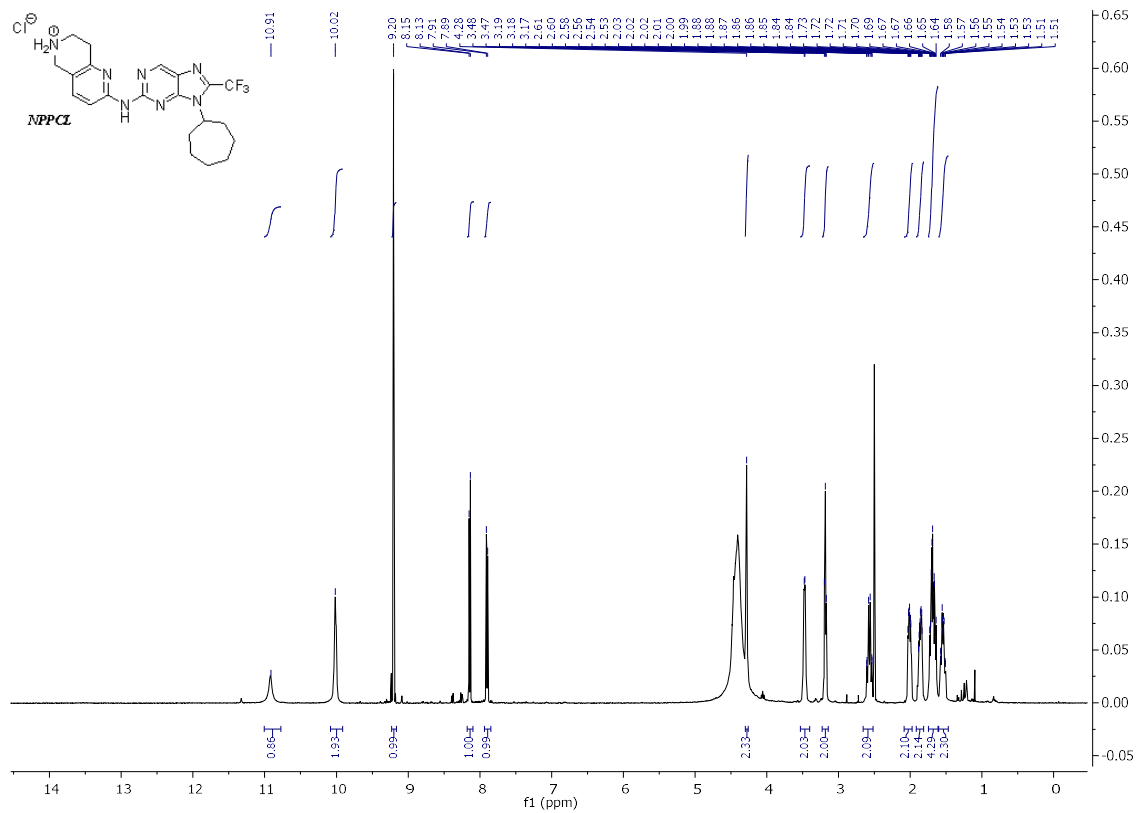


Spektrum 14: ^{13}C NMR *tert*-butyl 2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftiridin-6(5*H*)-karboxylátu (IX) v CDCl_3

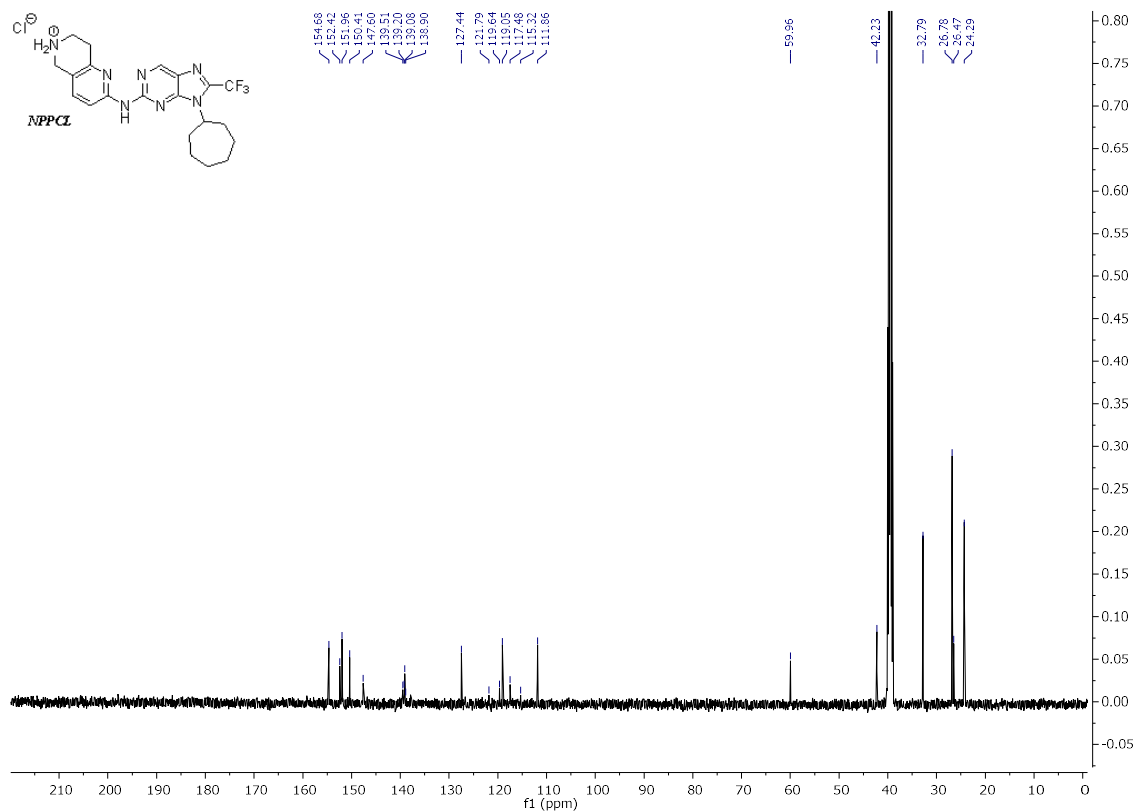
PCJB-051122-3-8
single_pulse decoupled



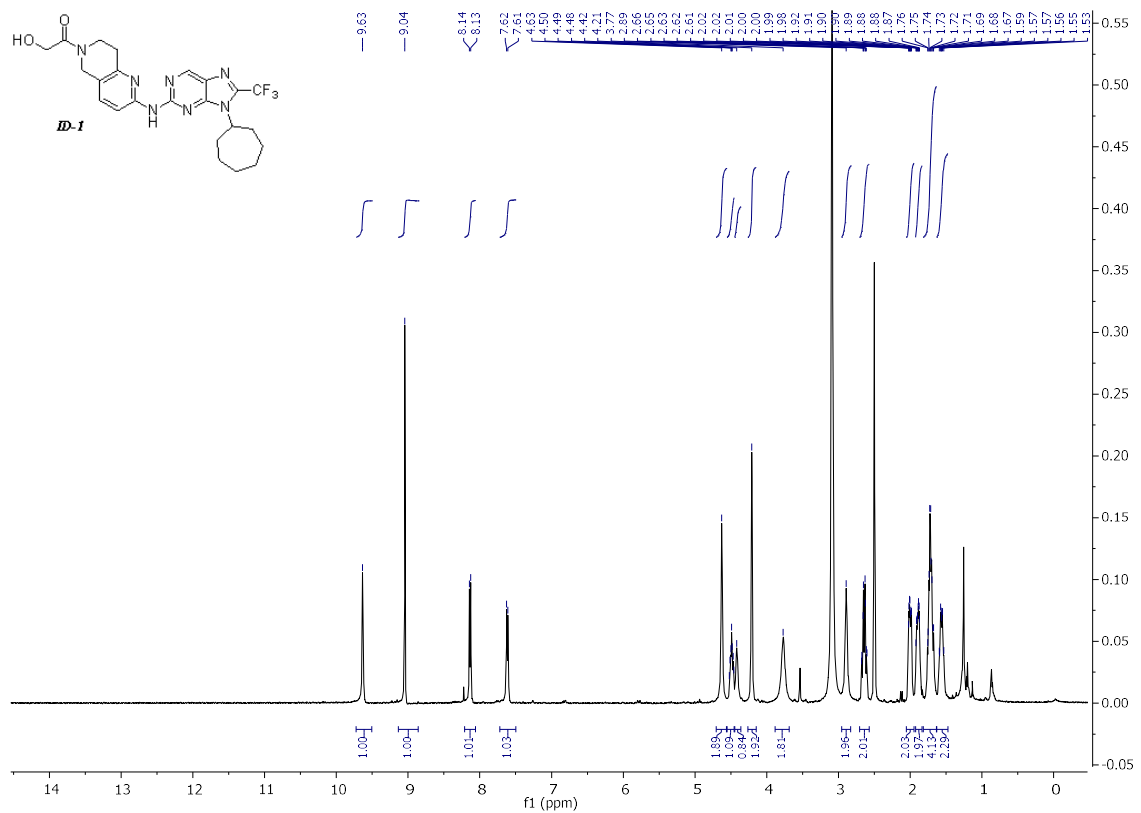
Spektrum 15: ^1H NMR *N*-(9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amonium chloridu (X-HCL) v DMSO- d_6



Spektrum 16: ^{13}C NMR *N*-(9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9*H*-purin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naftyridin-2-amonium chloridu (X-HCL) v DMSO- d_6



Spektrum 17: ^1H NMR 1-(2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9H-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5H)-yl)-2-hydroxyethan-1-onu (I) v DMSO- d_6



Spektrum 18: ^{13}C NMR 1-(2-((9-cykloheptyl-8-(trifluoromethyl)-9H-purin-2-yl)amino)-7,8-dihydro-1,6-naftyridin-6(5H)-yl)-2-hydroxyethan-1-onu (I) v DMSO- d_6

