

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2009-45**
(22) Přihlášeno: **28.01.2009**
(40) Zveřejněno: **04.08.2010**
(Věstník č. 31/2010)
(47) Uděleno: **13.09.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **20.10.2010**
(Věstník č. 42/2010)

(11) Číslo dokumentu:

302 122

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/02	(2006.01)
C07D 473/16	(2006.01)
A61K 31/52	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)
A61P 31/20	(2006.01)
A61P 31/22	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 98/05335, CZ 2001-4163, CZ 2001-2765, FR 2 876 583, US 2004/0235868, WO 2004/016612, WO 2004/016613.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
BioApex, s. r. o., Olomouc, Holice, CZ

(72) Původce:

Havlíček Libor, Praha 6, CZ
Kryštof Vladimír, Olomouc, CZ
Zatloukal Marek, Šumperk, CZ
Doležal Karel, Olomouc, CZ
Strnad Miroslav, Olomouc, CZ
Vojtěšek Bořivoj, Modřice, CZ

(74) Zástupce:

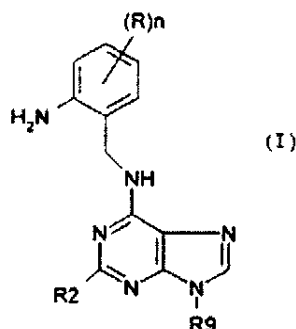
RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, Praha 5,
15000

(54) Název vynálezu:

Substituované deriváty 6-(2-aminobenzylamino)purinu, jejich použití jako léčiva a přípravky tyto sloučeniny obsahující

(57) Anotace:

Řešení se týká konkrétních 6-(2-aminobenzylamino)purinů se společným obecným vzorcem I, které se používají pro inhibici CDK, zejména při ošetřování virových infekcí a onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, jako jsou nádory, psoriáza, restenóza, revmatická artritida, atd., a farmaceutických přípravků tyto sloučeniny obsahující.



CZ 302122 B6

Substituované deriváty 6-(2-aminobenzylamino)purinu, jejich použití jako léčiva a přípravky tyto sloučeniny obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových purinových derivátů a jejich použití, zejména v léčbě virových a nádorových onemocnění.

10

Dosavadní stav techniky

Deregulace mechanismů kontrolujících průběh buněčného dělení je charakteristickým znakem nádorového bujení. Cyklin-dependentní kinázy (CDK) představují rodinu silně konzervovaných serin/threonin proteinkináz, které jsou aktivní v komplexu se svými regulačními jednotkami, cykliny. Lidský genom obsahuje 13 CDK, 48 CDK-příbuzných kináz a 25 cyklinů. Různí členové rodiny CDK zasahují do řady klíčových buněčných procesů: CDK1, 2, 3, 4, 6 a 7 regulují buněčný cyklus, CDK 7, 8 a 9 interagují přímo s transkripčními faktory, CDK5 a 11 kontrolují funkce nervových buněk, CDK2, 5, 6 a 9 buněčnou diferenciaci a CDK1, 2, 4, 5, 6 a 11 ovlivňují apoptózu (Knockaert a kol.: J. Biol. Chem. 277: 25493–25501, 2002). Funkce CDK jsou regulovány cykliny, CDK-inhibujícími proteiny a subcelulární lokalizací. Protože mnohé CDK jsou důležitými regulátory buněčného dělení, cílem farmaceutického průmyslu byl a je objev a vývoj farmakologických CDK inhibitorů (CDKI) jako potenciálních protinádorových léčiv. CDKI jsou rozmanitou a nesourodou skupinou malých roviných heterocyklů – purinů, pyrimidinů, flavonoidů nebo bis-indolů, vážících se do ATP-vazebného místa CDK, kde mohou kompetovat s ATP (de Azevedo a kol., Eur. J. Biochem. 243:518–526, 1997).

Klíčové regulátory cyklu jsou reprezentovány třemi skupinami proteinů: cykliny, cyklin-dependentními kinázami (CDK) a inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKI).

Prvními důležitými CDKI byly CDK oligo-specifický olomoucín a CDK pan-specifický flavopiridol (Losiewicz a kol., Biochem. Biophys. Res. Commun. 201(2):589–95, 1994). Olomoucín patří do skupiny C2, N6, N9-substituovaných adeninů, které vykazují vysokou aktivitu a specifitu proti některým CDK; olomoucín zejména inhibuje CDK2, CDK5, a méně již Erk1 (Veselý a kol., Eur. J. Biochem. 224: 771–786, 1994). Za účelem dosažení zvýšené inhibice CDK byla molekula olomoucínu podrobena strukturálním modifikacím. Výsledkem klasické studie vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, směřované na změny postranních řetězců olomoucínu, byl objev dvou výjimečně účinných inhibitorů CDK: roskovitinu (Seliciclib[®], CYC202, Cyclacel Pharmaceuticals, Berkeley Heights, New Jersey) a v poslední době olomoucínu II (Havlíček a kol. 1997. J. Med. Chem. 40: 408–412; Kryštof a kol. Bioorg. Med Chem Lett 12: 3283–3286, 2002).

Zvýšená aktivita roskovitinu oproti olomoucínu je způsobena zavedením rozvětveným C2-postranním řetězcům a objemnějším N9-isopropyl substituentu. Tyto změny významně zvýšily komplementaritu inhibitoru v ATP-vazebném místě CDK2, jak bylo dokázáno rentgenovou krystalografií (de Azevedo a kol. Eur. J. Biochem. 243:518–526, 1997). Obě strukturální změny nezměnily selektivitu roskovitinu, ale zvýšily 10–krát aktivitu roskovitinu na CDK1 a CDK2, a 20–krát na CDK5. Olomoucín II se liší od roskovitinu další *ortho*-hydroxy skupinou na benzylovém kruhu, přesto tato jediná modifikace je spojena s 10–krát vyšší inhibiční aktivitou na CDK9 (Kryštof a kol., J. Med. Chem. 49: 6500–6509, 2006). Tato zvýšená afinita olomoucínu II k CDK9 je zodpovědná za jeho zvýšenou intracelulární aktivitu, ve srovnání s roskovitinem. Například, olomoucín II indukuje jadernou akumulaci a transkripční aktivaci tumorového supresorového proteinu p53 při 2 až 3 nižších koncentracích než roskovitin. Při vyšších koncentracích mohou oba inhibitory inhibovat syntézu RNA zmírněním fosforylace CTD domény RNA polymerázy II (Diwan a kol., J. Virol. 78: 9352–65, 2004).

55

Zjištění, že roskovitin vykazuje také antivirální aktivitu, stimulovalo výzkum cílený na buněčné funkce, doložený příkladem CDK, nutné pro replikaci viru (Bresnahan a kol., J. Gen. Virol. 78:1993–7, 1997; Schang a kol., J. Virol. 73:2161–72, 1999). Roskovitin a další inhibitory CDK mají schopnost inhibovat replikaci širokého spektra virů, dokonce i v nedělících se buňkách, včetně činitelů, pro které není nutná progresse buněčného cyklu (Schang a kol., Antivir. Chem. Chemother. 17:293–320, 2006). Lidský cytomegalovirus (HCMV), herpes simplex typu 1 a 2 (HSV-1 & HSV-2), varicella zoster virus (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), lidský adenovirus (HAdV), lidský virus imunoneдостatečnosti (HIV), a lidský virus leukémie T-buněk (HTLV-1) jsou všechny citlivé k roskovitinu. Antivirové aktivity CDK inhibitorů korelují více s mírou CDK inhibice než se strukturou aktivní části inhibitoru (Schang a kol., Antivir. Chem. Chemother. 17:293–320, 2006).

I když bylo ukázáno, že inhibitory inhibují několik stádií replikace viru, včetně větvení, DNA replikace, reaktivace z latence, aktivace buněčných nebo virových enzymů a vnitrobuněčná kompartmentace, výzkum vedl k poznání že antivirová aktivita inhibitorů CDK je i primárně zprostředkována inhibicí virus-kódované transkripce (Kapasi & Spector, J. Virol. 82(1):394–407, 2008). Zajímavé je, že roskovitin může zamezit iniciaci virové transkripce, která je specifická pro virový genom a nezávislá na promotorech (Diwan a kol., J. Virol. 78: 9352–65, 2004). Zatímco flavopiridol je CDK panspecifický a inhibuje transkripci většiny buněčných a virových genů, roskovitin je CDK oligospecifický a neinhibuje buněčnou transkripci. Selektivita roskovitinu v potlačování exprese virálně a plazmidově kódovaných genů se podobá aktivitě popsané pro interferon alfa (Nicholl & Preston, J. Virol. 70: 6336–9, 1996). V tomto kontextu je zajímavé poznamenat, že interferon alfa také inhibuje CDK a podněcuje zastavení buněčného cyklu (Mandal a kol., Oncogene 16(2):217–25, 1998).

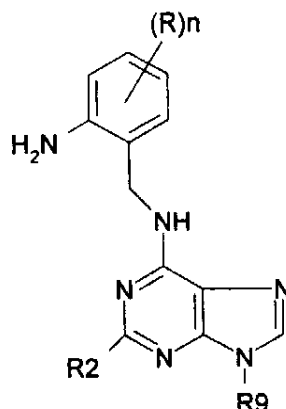
Mechanismus, kterým inhibitory CDK potlačují replikaci viru, nebyl doposud plně objasněn a předpokládá se, že nebude pro různé látky zcela shodný. Proto bylo velmi důležité empiricky srovnat antivirové vlastnosti roskovitinu a jeho analog. V naší předcházející studii jsme zjistili, že olomoucín II a mnoho dalších látek bylo účinnějšími inhibitory aktivity CDK než roskovitin (Kryštof a kol., J. Med. Chem. 49: 6500–6509, 2006).

Podstata vynálezu

V tomto vynálezu popisujeme, že amino analoga olomoucínu II inhibují virově-kódovanou transkripci a replikaci viru při podstatně nižších koncentracích než roskovitin. Navíc, tyto sloučeniny vykazují antivirovou aktivitu na široké spektrum lidských virů, včetně orthopoxviru, HAdV, HSV-1 a HCMV. V souladu s předchozími výzkumy roskovitinu (Diwan a kol., J. Virol. 78:9352–65, 2004), látky byly účinné na virových promotorech, které nejsou inkorporovány do buněčných genomů. Kromě toho ukazujeme, že naše látky a užití Cidofoviru má synergický efekt na buňkách infikovaných adenovirem.

Substituované deriváty 6-(2-aminobenzylamino)purinu podle tohoto vynálezu jsou použitelné jako inhibitory cyklin-dependentní kinázy 9. Tato skupina nových purinových derivátů je charakteristická selektivní CDK9 inhibiční aktivitou doprovázenou silnými protinádorovými vlastnostmi látek, zejména na virově vyvolané nádorové bujení. Proto mohou být tyto látky použity jako antimitotická a apoptotická léčiva, zejména jako protinádorová léčiva. Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout sloučeniny s protinádorovou a antivirovou aktivitou, látky mající vylepšený index selektivity a účinnosti, tedy jsou méně toxické a přitom efektivnější než analoga známá doposud. Navíc, látky zde popsané inhibují virově kódovanou transkripci a replikaci účinněji než jiné látky dosud známé.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny, spadající do obecného vzorce I,



(I),

vybrané ze skupiny zahrnující

- 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)-2-methylpropan-2-ol,
 3-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)pentan-2-ol,
 N⁶-(2-amino-5-chlorbenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 2-({6-[(2-amino-5-fluorbenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 1-({6-[(2-amino-3-methoxybenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-methoxybenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-ethyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-propyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-benzyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-benzyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-5-chlorbenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-5-fluorbenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-3-methoxybenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-ethyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-propyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-3-methylbenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2,5-diaminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklohexyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-benzyl-9H-purin-2,6-diamin,

N^6 -(2-aminobenzyl)- N^2 -(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin,
 N^6 -(2-aminobenzyl)- N^2 -(4-hydroxycyklohexyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin,
 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9*H*-purin-2-yl}amino)-2-methylpropan-2-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9*H*-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 5 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-ethyl-9*H*-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-3-methoxybenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9*H*-purin-2-yl}amino)-butan-1-ol.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny podle předloženeho vynálezu pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny podle předloženeho vynálezu pro použití jako inhibitory CDK. Sloučeniny inhibují selektivně zejména enzym CDK9.

Substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny mají velmi vysokou účinnost vůči živočišným a lidským RNA a DNA virům. Nové deriváty vykazují antivirovou aktivitu napříč širokou paletou zejména lidských virů, jakými jsou orthopoxiviry, HAdV, HSV1 a HCMV. Předmětem vynálezu je proto rovněž poskytnout substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny pro použití k léčbě virových infekcí. Dalším aspektem tohoto vynálezu jsou substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny pro použití při výrobě léčiva pro léčení virových infekcí.

Kromě toho jsou chirálně obohacené nebo čisté (S)-enantiomery antivirově aktivnější, zatímco (R)-enantiomery byly znatelně méně antivirově aktivní. Důležitým aspektem tohoto vynálezu je použití sloučenin podle vynálezu pro inhibici proliferace DNA virů závislých na jevech spojených s buněčnou proliferací nebo replikací. DNA viry zahrnují jakýkoliv virus z rodiny herpesvirů, a zvláště lidských cytomegalovirů. Použití zahrnuje podání profylakticky nebo terapeuticky účinného množství inhibitoru CDK pacientům nebo zvířatům. Terapeuticky účinné množství je takové, které je schopné inhibice buněčné aktivity CDK9 v rozsahu zabráňujícím virové replikaci. Ostatní herpesviry, jakými je například herpes simplex, ale i ostatní cytomegaloviry, jsou rovněž vyléčitelné metodami tohoto vynálezu.

Příkladné virové infekce zahrnují infekce vyvolané DNA nebo RNA viry zahrnujícími herpesviry (herpes simplex virus typ 1 (HSV-1), HSV-2, virus varicella zoster (VZV), virus Epstein-Barrové (EBV), cytomegalovirus (CMV), lidský herpesvirus typ 6 (HHV-6), HHV-7, HHV-8, 35 boviní herpesvirus typ 1, koňský herpesvirus typ 1), papillomaviry (HPV typ 1 až 55, zahrnující karcinogenní HPV), flaviviry (zahrnující virus žluté zimnice, virus africké prasečí horečky a virus japonské encefalitidy), togaviry (včetně viru venezuelské koňské encefalomyelitidy), chřipkové viry (typ A až C), retroviry (HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II, SIV, FeLV, FIV, MoMSV), adenoviry (typ 1 až 8), poxviry (virus vakcinie), enteroviry (poliovirus typ 1 až 3, 40 Cossacie, hepatitis A virus, a ECHO virus), gastroenteritické viry (Norwalk virus, rotaviry), hantaviry (Hantaan virus), polyomavirus, papovaviry, rinoviry, parainfluenza virus typ 1 až 4, viry vztekliny, respirační syncytiální virus (RSV), viry hepatitidy A, B, C a E, a podobné.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaný 6-(2-aminobenzylamino)purinových derivátů pro léčbu virových infekcí vyvolaných DNA viry v kombinaci s obvykle používanými virostatiky jakými jsou acyklovirus, cidofovir, tamiflu a ribavirin.

Antivirová aktivita jednotlivých sloučenin se může stanovit běžnými testy antivirové (nebo jiné antimikrobiologické) aktivity za použití testů enzymové inhibice, testů na tkáňových kulturách, 50 testů na zvířecích modelech a podobně, jak je známo odborníkům v oboru.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být rovněž (1) aplikovány v systémech tkáňových kultur k eliminaci nebo redukci virového šíření nebo růstu při produkci biofarmaceutických nebo jiných produktů (jakými jsou proteiny nebo vakcíny), (2) použity k eliminaci nebo redukci viro-

vého šíření nebo růstu v klinických vzorcích (např. v krvi) a (3) použity k zastavení růstu tkáňových buněčných kultur při zachování schopnosti buněk produkovat proteiny. Významem vynálezu jsou tedy substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I pro použití v eliminaci nebo redukci virového šíření nebo růstu v systémech tkáňových kultur při produkci biofarmaceutických nebo jiných produktů, jakými jsou proteiny a vakcíny, pro eliminaci nebo redukci virového šíření nebo růstu v klinických vzorcích, jakými je např. krev, anebo k zastavení růstu tkáňových buněčných kultur při zachování schopnosti buněk produkovat proteiny a sekundární metabolity (antibiotika, sekundární rostlinné produkty, apod.).

Předmětem vynálezu jsou rovněž substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny podle předloženého vynálezu pro použití jako inhibitory buněčné proliferace a/nebo induktory apoptózy.

Předmětem vynálezu je dále použití substituovaných 6-(2-aminobenzylamino)purinů pro výrobu léčiv pro léčbu onemocnění, která zahrnují buněčnou proliferaci, jakými jsou nádory, restenóza, psoriáza, revmatická artritida, lupenka, diabetes I. typu, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, parazitózy způsobené živočichy, houbami anebo prvoky, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu (onemocnění štěp versus hostitel), dna, anebo proliferativní onemocnění kůže.

Předmětem vynálezu je dále způsob inhibice CDK, zejména selektivní inhibice CDK9, inhibice buněčné proliferace anebo indukce apoptózy u savců, která zahrnuje podání terapeuticky účinného množství kompozice obsahující látku obecného vzorce I savcům.

Kromě ostatních CDK-příbuzných kináz, CDK9 kináza kontroluje určité kroky cyklu buněčného dělení, zejména přechod z G₁ fáze do S fáze a dále pak přechod z G₂ fáze do M fáze. Sloučeniny obecného vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelné soli mohou být použity jako antimitotické látky a pro léčbu proliferativních onemocnění. Při velmi nízkých koncentracích (mikromolární a nižší) jsou schopné inhibovat přechody buněčného cyklu (G₁/S, G₂/M, M-fáze/metafáze), které probíhají v živočišných tělech a v embryích. Kromě toho jsou tyto sloučeniny použitelné při léčbě autoimunitních onemocnění, např. revmatoidní artritidy, lupenky, diabetu I. typu, roztroušené sklerózy; při léčení Alzheimerovy choroby, kardiovaskulárních onemocnění, jakými jsou restenóza, odmítnutí transplantátu (onemocnění štěp versus hostitel), dna a při léčení nádorů, polycystického onemocnění ledvin a ostatních proliferativních onemocnění, jejichž patogeneze zahrnuje abnormální buněčnou proliferaci.

Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty mohou být použity pro léčení onemocnění, jejichž patogeneze zahrnuje abnormální buněčnou proliferaci, v kombinaci s obvykle používanými cytostatiky, jakými jsou mitoxantron, cis-platina, methotrexát, taxol nebo doxorubicin.

Kromě terapeutických aplikací (pro lidské a veterinární použití) mohou být substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny použity jako aditiva ve tkáňových kulturách pro kontrolu stavů proliferace a/nebo diferenciac buněk in vitro, například cestou kontroly hladiny aktivní CDK1/2 a CDK9.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6-(2-aminobenzylamino)purinů pro inhibici katalytické aktivity cyklin-dependentních kináz, a to prostřednictvím interakce těchto sloučenin s ATP-vazebným místem těchto enzymů. Takovéto sloučeniny jsou zejména žádoucí pro redukci nadměrného buněčného růstu, neboť umožňují inhibici kinázové aktivity bez ohledu na příčinu nadměrné kinázové aktivity vedoucí k hyperproliferaci. Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou tedy aktivní v situacích, ve kterých je mutovaná kináza hyperaktivní, a situacích, ve kterých je kináza přítomná ve zvýšených hladinách. Sloučeniny podle vynálezu mohou rovněž blokovat nadbytečnou kinázovou aktivitu v situacích, kdy cyklin regulující danou kinázu je přítomen v nadbytečných hladinách, nebo je mutován či je jeho vazba k CDK zvýšená. Konečně, sloučeniny podle tohoto vynálezu, které blokují kinázovou aktivitu prostřednictvím interakce

s ATP vazebným místem enzymu, jsou rovněž vhodné pro inhibici kinázové aktivity v situacích, kdy přirozený proteinový inhibitor CDK–cyklin komplexů je mutován.

Předmětem vynálezu je rovněž použití substituovaných 6–(2–aminobenzylamino)purinů pro aktivaci nádorového supresoru p53, který je vlastní všem savcím buňkám, kde působí jako přirozený supresorický gen zastavující nekontrolované buněčné dělení (nádory) a je schopen vypnout nádorový vývoj buněk. p53 stejně jako retinoblastomový protein (pRb) jsou dobře charakterizované nádorové supresory, jejichž inaktivace může vést k nekontrolované proliferaci a malignitě. Fosforylace těchto dvou proteinů, které jsou zapojeny do regulačních mechanismů buněčného cyklu, moduluje významně jejich funkci a aktivitu. Z toho vyplývá, že silně aktivní regulátory p53 představují vhodný nástroj pro terapii nádorových onemocnění, a to cestou indukce wild typu p53 proteinu ve vybraných typech nádorů.

Studie probíhající s deriváty podle tohoto vynálezu prokázaly, kromě jiného, silný účinek na apoptózu v řadě nádorových buněčných linií. Bylo pozorováno, že apoptóza může být indukována ve fázi G₁ nebo G₂ a v souvislosti s poškozením DNA; některé buňky zastaví v G₁ fázi a p53–dependentní apoptotická dráha je poté indukována. V jiných situacích dochází k tomu, že buňky zastavují v G₂/M přechodu jako reakce na poškození DNA a pak je pozorována aktivace p53–nezávislé apoptotické dráhy. Tato dráha je zejména významná v terapii nádorů, u kterých je pozorován nedostatek aktivního p53. Je proto důležitá i aplikace nových derivátů, které stimulují p53–nezávislou apoptózu v buňkách, které se zastavily v G₂ fázi vlivem poškození DNA při použití agens jakými jsou mitoxantron nebo cis–platina. CDK inhibitory z tohoto vynálezu tak mohou zvýšit terapeutický potenciál současně používaných protinádorových látek.

Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek obsahující alespoň jeden substituovaný 6–(2–aminobenzylamino)purin a farmaceuticky přijatelný nosič.

Nové sloučeniny mohou být podle tohoto vynálezu použity jako takové a nebo jako intermediáty při přípravě nových sloučenin majících řadu diagnostických, terapeutických a průmyslových použití.

Způsoby přípravy

Výchozím materiálem pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I je 2,6–dichlorpurin připravený z hypoxantinu a hypoxanthin–1–N–oxidu chlorací pomocí POCl₃ (Davoll a Blowy, *J. Am. Chem. Soc.* 1957;73:2936). Tento výchozí materiál je rovněž dostupný z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.).

V jednom přístupu se 2,6–disubstituovaný purin obecného vzorce I připraví z 2,6–dichlorpurinu reakcí s příslušným nukleofilem. 2,6–Dichlorpurin je rozpuštěn v n–butanolu a poté je přidán příslušný R⁶–amin (1,5 až 5 ekv.) a několikanásobný přebytek triethylaminu. Po zahřátí po dobu několika hodin je reakční směs zchlazena a je tak získán 2–chlor–6–substituovaný purin. R⁹ substituované deriváty jsou připraveny z 2–chlor–6–substituovaných purinů (v DMSO nebo DMF), ke kterým se přidá práškový uhličitán vápenatý (přibližně 3 ekv.) a poté R⁹–halogen. Po několika hodinách až dnech intenzivního míchání je produkt izolován pomocí kapalinové chromatografie. Substituce na C²–Cl je nakonec dovršena reakcí s druhým nukleofilem (5 až 30 ekvivalentů substituovaných aminů, aminoalkanoly; merkaptoderiváty za přítomnosti N–methylpyrrolidinu nebo N–ethyl-diisopropylaminu) při teplotě 160 až 180 °C. Tento produkt je nakonec izolován kapalinovou chromatografií nebo krystalizován z n–BuOH nebo vody.

TERAPEUTICKÁ APLIKACE

5 Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intrathekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

10 Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

15 Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

20 Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. 25 běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

30 Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, 35 brasidovou a linolenovou, případně s přísadkou antioxidantů, např. vitaminu E, β -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako methanol, ethanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyloléat, isopropylmyristát, 40 isopropylpalmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylenglycerol trioléat, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasy- 45 cených mastných kyselin s délkou řetězce C_8 až C_{12} od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

50 Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

55 Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přísadkou dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulóзовé preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo, pokud je to požadováno, desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylenglykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulóзовých preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky které mohou být užívány orálně jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylenglykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylenglykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylenglykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty, kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Rostoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafinový olej nebo tvrdé parafíny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi

jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylenglykol, sorbitol a/nebo polyethylenglykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

5 Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelinu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva
10 zmíněná v souvislosti s mastmi, které zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo stearyl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafinový olej.
15 Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných
20 alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylenglykol a polyethylenglykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

25 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

30 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

35 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolicou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylenglykol, dále promazávací látky jako estery mastných kyselin a nižších polyethylenglykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodě směsí nahrazující tukové látky odstraněné z kůže ethanolem, a pokud je
40 to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně
45 a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických
50 přípravků, přednostně v množství které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takového ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Přehled obrázků na výkresech

5 Obr. 1 ukazuje dávkově závislé antiproliferativní účinky vybraných purinových derivátů na lidských nádorových buněčných liniích MCF7 a K562, s roskovitinem jako standardem.

10 Obr. 2 ukazuje imunoblotové analýzy MCF7 buněk ošetřených po dobu 24 h indikovanými koncentracemi sloučeniny **105**. Byla pozorována redukovaná fosforylace pRb na Ser780, Ser807 a Thr821, což naznačuje pokles aktivity CDK4 a CDK2. Indukce hladin nádorového supresoru p53 a p21^{WAF1} spolu s redukovanou fosforylací CTD v RNA polymeráze II naznačuje blok transkripce.

15 Obr. 3 ukazuje dávkově závislý účinek sloučeniny **105** a roskovitinu na p53–závislou transkripci. A, Buňky Arn8 stabilně transfekované p53–responzivním β–galaktosidázovým reportérovým konstruktem byly ošetřeny rozdílnými inhibitory CDK po dobu 24 h a pozitivní buňky byly spočteny pomocí světelného mikroskopu pro každou koncentraci v triplicátech. B, indukce proteinů p53 a p21^{WAF1} v buňkách Arn8 ošetřených indikovanými koncentracemi CDK inhibitorů. C, indukce proteinů p53 a p21^{WAF1} v huňaci MCF–7 po ošetření sloučeninou **105**. Buňky byly sklizeny a proteiny byly separovány na 10% SDS–PAGE gelu a analyzovány na Western blotech specifickými protilátkami.

Obr. 4 ukazuje celkovou váhu myši transplantovaných leukémií P388D1, které byly intraperitoneálně ošetřeny vybraným inhibitorem CDK.

25 Obr. 5 ukazuje analýzu přežití myši transplantovaných leukémií P388D1, které byly ošetřeny intraperitoneálně vybraným inhibitorem CDK.

Obr. 6 ukazuje celkovou váhu myši transplantovaných lidským plicním adenokarcinomem A549, které byly ošetřeny intraperitoneálně vybraným inhibitorem CDK.

30 Obr. 7 ukazuje analýzu nádorového objemu myši transplantovaných lidským plicním adenokarcinomem A549, které byly ošetřeny intraperitoneálně vybraným inhibitorem CDK.

35 Obr. 8 ukazuje infekci buněčných linií MCF–7 (wild typ p53) a T47D (mutant p53) SV40. Expres virálního proteinu – Velký T–antigen. p53 transkripční aktivita je reprezentována p21^{WAF1} transaktivací.

40 Obr. 9 ukazuje inhibici exprese z extrachromosomálního plazmidu pomocí PCIs. Expres β–galaktosidázy z transientně transfekovaného plazmidu pCMV–lacZ v buněčných liniích MCF–7 (wild typ p53) a T47D (mutantní p53).

45 Obr. 10 ukazuje inhibici exprese z virálního promotoru inkorporovaného do buněčného genomu. Indukce SV40 velkého T–antigenu a p53 transkripční aktivity (p21^{WAF1} transaktivace). CV–1 a MCF–7 jsou kontrolní buněčné linie (žádná exprese velkého T antigenu).

50 Obr. 11 ukazuje inhibici transkripce z virálního promotoru pomocí PCI závislé na lokalizaci promotoru. Inhibice exprese β–galaktosidázy z plazmidu pHIV–lacZ transientně transfekované do H1299–TAT buněčné linie a stimulace exprese β–galaktosidázy z plazmidu pHIV–lacZ inkorporované do buněčného genomu (buněčná linie H1299–HIV) po ošetření PCI. Buněčná linie H1299 transientně transfekovaná plazmidem pHIV–lacZ byla použita jako negativní kontrola. Tato buněčná linie neprodukuje β–galaktosidázu, a to z důvodu virálního proteinu TAT, který je exprimován z plazmidu pCEP4–Tat stabilně transfekovaného do buněčných linií H1299–TAT a H1299–HIV.

Obr. 12A ukazuje fosforylaci CTD RNA polymerázy II v buněčné línii s inkorporovaným SV40. Fosforylace obou serinů, tedy serinu 2 a serinu 5 je inhibována 12 hodinovým ošetření roskovitinem a sloučeninou **105** ve všech testovaných buněčných liniích.

- 5 Obr. 12B ukazuje porovnání fosforylace CTD RNA polymerázy II v buněčné línii s inkorporovaným (H1299–HIV) nebo transientně transfekovaným (H1299–TAT) plazmidem HIV–lacZ. Fosforylace sér 2 a sér 5 v obou buněčných liniích je inhibována po PCI po 12 h.

- 10 Obr. 13 ukazuje inhibici replikace HAd4. Multistupňová růstová křivka HAd4 v přítomnosti 10 µM sloučeniny **105**, 100 µM Cidofoviru (CID) nebo obou (OCII+CID). Časový bod 0 h představuje virové inokulum. A. Celkový výnos viru z kultury (buněčně asociovaný + extracelulární). B. Extracelulární virus.

15 Příklady provedení vynálezu

Následující příklady slouží k objasnění vynálezu, aniž by omezovaly jeho rozsah.

- 20 Výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce I je 2,6–chlorpurin, dostupný z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.). Teploty tání byly stanoveny na Kofflerově bloku a nejsou korigovány. Na měření teploty tání byl použit přístroj BÜCHI Melting Point B–540 Apparatus. Elementární analýzy (C,H,N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Thermo Finnigan). Odpařování bylo prováděno na rotační vakuové odparce při teplotách nižších než 80 °C. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance AV 300 při teplotě 26 °C a frekvenci 300,13 MHz (¹H), respektive 75,48 MHz (¹³C). Vzorky byly připraveny rozpuštěním
- 25 daných látek v DMSO–d₆. Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard. EI hmotnostní spektra byla měřena pomocí Polaris Q (Finnigan) hmotnostního spektrometru vybaveného sondou pro přímý vstup vzorku (DIP) (70 eV, teplotní gradient 40 až 450 °C, interval m/z 50 až 1000 u za použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy (70 eV, 200 °C, direct inlet). ES+ hmotová spektra byla naměřena za použití přímého nástřiku na Waters ZMD 2000 hmotovém spektrometru. Hmotnostní interval při měření byl 10 až 1500 u. Spektra byla měřena za použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy, při napětí na vstupní šterbině 25 V a teplotě vypařovacího bloku 150 °C, desolvatační teplotě 80 °C a průtoku desolvatačního plynu 200 l/hodinu. Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx data system. Merck silica gel Kieselgel 60 (230 až 400 mesh) byl použit pro kolonovou chromatografii. Všechny připravené látky poskytovaly uspokojivé výsledky elementární analýzy (± 0,4 %). Analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách silica gel 60 WF₂₅₄ (Merck), v mobilní fázi CHCl₃:MeOH:konc.NH₄OH (8:2:0,2, v/v/v).

- 40 Výchozí 9–alkyl–2,6–dichlorpuriny byly připraveny za použití postupů popsanych v literatuře:

9–methyl–2,6–dichlorpurin

1) Parker et al. Phytochemistry 25, 1986: 303 – 310

2) Brik et al. Bioorg. Med. Chem. 13, 2005: 4622 – 4626;

9–ethyl–2,6–dichlorpurin

- 45 Pitts et al. Bioorg. Med. Chem. Let. 14, 2004: 2955 – 2958

9–isopropyl–2,6–dichlorpurin

1) Rypka et al. Xenobiotica 32, 2002: 1017 – 1032

2) Lu et al. J. Org. Chem. 72, 2007: 5012 – 5015

9–benzyl–2,6–dichlorpurin

- 50 1) Kelley et al. J. Med. Chem. 31; 1988: 2001 – 2004

2) Naito et al. Chem. Pharm. Bul. 30, 1982: 2011 – 2019

3) Dalby et al. Angew. Chem. German 105, 1993: 1822 – 1823

4) Brik et al. Bioorg. Med. Chem. 13, 2005: 4622 – 4626

5) Weterings et al. Bioorg. Med. Chem. Let. 16, 2006: 3258 – 3261

- 55 6) Toyota et al. Synth. Commun. 23, 1993: 1295 – 1305

7) Gundersenet al. Tetrahedron Let. 36, 1995: 1945 – 1948

8) Lu et al. J. Organ. Chem. 72, 2007: 5012 – 5015

9-cyklopropyl-2,6-dichlorpurin

2,6-Dichlorpurin (1 mmol), práškový uhlíčitán draselný (4 mmol) a cyklopropyljodid (5 mmol) byly prudce míchány v 5 ml DMSO přes noc. Po odpaření rozpouštědel byl produkt extrahován do směsi voda/diethylether) a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (silikagel/1% MeOH v chloroformu). Rekrystalizace z diethyletheru poskytla produkt ve výtěžku 35 %, s teplotou tání 121 až 124 °C.

9-cyklopentyl-2,6-dichlorpurin

1) Shum et al. Nucleos. Nucleot. 20, 2001: 1067 – 1078

2) Drezér et al. J. Med. Chem. 44, 2001: 524 – 530

9-cyklohexyl-2,6-dichlorpurin

2,6-Dichlorpurin (1 mmol), práškový uhlíčitán draselný (4 mmol) a cyklohexyljodid (5 mmol) byly prudce míchány v 5 ml DMSO přes noc. Po odpaření rozpouštědel byl produkt extrahován do směsi voda/diethylether) a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie (silikagel/1% MeOH v chloroformu). Rekrystalizace z diethyletheru poskytla produkt ve výtěžku 41 %, s teplotou tání 116 až 121 °C.

20 Příklad 1

Příprava prekurzoru 9-alkyl-6-[(2-amino-R_n-benzyl)amino]-2-chlorpurinu

9-Alkyl-2,6-dichlorpurin (2 mmol), 2-aminobenzylamin (2,5 mmol) a triethylamin (0,4 ml) byly zahřívány v 5 ml 1-butanolu (110 °C, 1,5 h). Produkt vykristaloval z reakční směsi v průběhu zahřívání, případně po ochlazení na 4 °C. Produkt byl zfiltrován a promyt 1-butanolem. Pouze 9-(pent-3-yl)-2-chlor-6-[(2-amino-R_n-benzyl)amino]puriny byly izolovány pomocí kolonové chromatografie (silikagel, CHCl₃/MeOH: 99/1). Produkty byly rekrystalizovány ze směsi CHCl₃-Et₂O.

30 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-methylpurin: Výtěžek 91 %; tt 202 až 210 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 30 °C): 4,459 (2H, br s), 4,746 (2H, br s), 3,650 (3H, s), 6,446 (1H, br s), 6,673 (1H, dd, J = 1,2,7,9), 6,717 (1H, mt), 7,10 (1H, mt), 7,15 (1H, dd, J = 7,7,1,2), 7,682 (1H, s).

35 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-ethylpurin: Výtěžek 90 %; tt 190 až 198 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 30 °C): 1,552 (3H, t, J = 6,8), 4,150 (2H, q, J = 6,8), 4,459 (2H, br s), 4,746 (2H, br s), 6,446 (1H, br s), 6,673 (1H, dd, J = 1,2, J = 7,9), 6,717 (1H, mt), 7,10 (1H, mt), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,2), 7,682 (1H, s).

40 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-isopropylpurin: Výtěžek 93 %; tt 190 až 192 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 30 °C): 1,560 (6H, d, J = 6,8), 4,459 (2H, br s), 4,746 (2H, br s), 4,792 (1H, sept, J = 6,8), 6,446 (1H, br s), 6,673 (1H, dd, J = 1,2, J = 7,9), 6,717 (1H, mt), 7,10 (1H, mt), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,2), 7,682 (1H, s).

45 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-cyclopropylpurin: Výtěžek 88 %; tt 204 až 220 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 30 °C): 1,68 (4H, mt), 3,61 (1H, mt), 4,22 (2H, br s), 5,90 (2H, brs), 6,61 (2H, mt), 6,75 (1H, d, J = 7,7), 7,0 (1H, t, 7,7), 7,90 (1H, brs), 7,84 (1H, s).

6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-(pent-3-yl)purin: Výtěžek 90 %; tt 172 až 183 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 30 °C): 1,05 (6H, t, J = 3,4), 1,75 (2H, mt), 1,87 (2H, mt), 4,11 (1H, m), 4,22 (2H, br s), 5,90 (2H, br s), 6,61 (2H, mt), 6,75 (1H, d, J = 7,7), 7,00 (1H, t, J = 7,7), 7,91 (1H, br s), 8,89 (1H, s).

50 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-cyclopentylpurin: Výtěžek 89 %; tt 164 až 176 °C; ¹H-NMR (300,13 MHz, CDCl₃, 303K): 1,80–1,90 (2H, mt), 1,93–2,10 (4H, mt), 2,25–2,40 (2H, mt), 4,459 (2H, br s), 4,746 (2H, br s), 4,99 (1H, pent, J = 7,0), 6,446 (1H, br s), 6,673 (1H, dd, J = 1,2, J = 7,9), 6,717 (1H, mt), 7,10 (1H, mt), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,2), 7,682 (1H, s).

6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-cyclohexylpurin: Výtěžek 89 %; tt 165 až 174 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300,13 MHz, CDCl_3 , 30 °C): 1,29 (2H, mt), 1,49 (2H, mt), 1,73 (2H, mt), 1,91 (2H, mt), 2,06 (2H, mt), 4,22 (2H, br s), 5,38 (1H, mt), 5,93 (2H, br s), 6,62 (2H, mt), 6,74 (1H, d, $J = 7,7$), 7,02 (1H, t, $J = 7,7$), 7,91 (1H, br s), 8,52 (1H, s)

5 6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-benzylpurin: Výtěžek 94 %; tt 200 až 211 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300,13 MHz, CDCl_3 , 30 °C): 4,21 (2H, br s), 5,91 (2H, br s), 6,60 (2H, m), 6,74 (1H, d, $J = 7,7$), 7,02 (4H, mt), 7,14 (2H, dd, $J = 7,5$, 1,2), 7,90 (1H, br s), 8,49 (1H, s)

6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-chlor-9-cyclopentylpurin: Výtěžek 89 %; tt 164 až 176 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300,13 MHz, CDCl_3 , 30 °C): Výtěžek 93 %; tt 190 až 192 °C; $^1\text{H-NMR}$ (300,13 MHz, CDCl_3 , 303K): 1,80–1,90 (2H, mt), 1,93–2,10 (4H, mt), 2,25–2,40 (2H, mt), 4,459 (2H, br s), 4,746 (2H, br s), 4,99 (1H, pent, $J = 7,0$), 6,446 (1H, br s), 6,673 (1H, dd, $J = 1,2$, $J = 7,9$), 6,717 (1H, mt), 7,10 (1H, mt), 7,15 (1H, dd, $J = 7,7$, 1,2), 7,682 (1H, s).

15 Příklad 2

Příprava 2-alkylamino-9-alkyl-6-[(2-amino- R_n -benzyl)amino]purinů

20 6-[(2-amino- R_n -benzyl)amino]-2-chlor-9-alkylpurin (1 mmol), odpovídající amin (3 mmol) a diisopropylethylamin (2 mmol) byly zahřívány (teplota a reakční doba je specifikována pro každou níže uvedenou látku) v N-methylpyrrolidonu (5 ml, zatavená ampule). Reakční směs byla pak vytřepána do směsi voda: CHCl_3 (1:1, v/v). Kolonová chromatografie (silikagel, chloroform/methanol) následně poskytla čistý produkt.

N-6-(2-aminobenzyl)-*N*-2-heptyl-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin

25 Reakční podmínky: 155 °C, 2 h. Kapalinová chromatografie 1% MeOH v CHCl_3 ; krystalizace z abs. Et_2O ; tt 65 až 72 °C. $^1\text{H-NMR}$, δ ppm: 0,90 (3H, t, $J = 6,8$, C^{25}H), 1,31 (4H, m, $\text{C}^{20,21}\text{H}$), 1,38 (2H, m, C^{22}H), 1,54 (6H, d, $J = 6,8$, $\text{C}^{17,18}\text{H}$), 1,64 (2H, m, C^{24}H), 2,39 (2H, t, $J = 8,2$, C^{23}H), 3,44 (2H, q, $J = 6,8$, C^{19}H), 4,65 (1H, sep, $J = 6,8$, C^{16}H), 4,70 (2H, bs, N^{11}H), 4,78 (2H, d, $J = 5,9$, C^9H), 5,40 (1H, bs, N^2H), 6,34 (1H, bs, N^6H), 6,65 (1H, dd, $J = 7,7$, 1,1, C^{12}H), 6,71 (1H, tt, $J = 7,7$, 1,3, C^{14}H), 7,10 (1H, tt, $J = 7,7$, 1,5, C^{13}H), 7,14 (1H, dd, $J = 7,7$, 1,3, C^{15}H), 7,44 (1H, s, C^8H), $^{13}\text{C-NMR}$, δ ppm: 14,74 (C25), 23,18 (C16, 17), 23,30 (C24), 27,71 (C22), 29,78 (C21), 30,43 (C23), 32,47 (C20), 42,61 (C19), 42,81 (C9), 47,27 (C16), 114,48 (C5), 116,52 (C12), 118,76 (C14), 123,11 (C10), 129,75 (C13), 131,21 (C15), 135,63 (C8), 146,24 (C11), 151,07 (C4), 154,58 (C6), 158,69 (C2).

35 (RS)-1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol
Reakční podmínky: 155 °C, 2 h. Kapalinová chromatografie 1,5% MeOH v CHCl_3 ; rekrystalizace z abs. CHCl_3 ; tt 175 až 179 °C. $^1\text{H-NMR}$, δ ppm: 1,26 (3H, d, $J = 6,4$, C^{21}H), 1,55 (6H, d, $J = 6,8$, $\text{C}^{17,18}\text{H}$), 3,41 (1H, m, C^{19}H_a), 3,55 (1H, m, C^{19}H_b), 4,07 (1H, quiqui, $J = 6,8$, 2,6, C^{20}H), 4,60 (1H, bs, O^{20}H), 4,64 (1H, sep, $J = 6,8$, C^{16}H), 4,68 (2H, bs, N^{11}H), 4,79 (2H, bs, C^9H), 6,08 (1H, bs, N^2H), 6,60 (1H, bs, N^6H), 6,68 (1H, dd, $J = 7,8$, 1,1, C^{12}H), 6,74 (1H, tt, $J = 7,5$, 1,1, C^{14}H), 7,12 (1H, tt, $J = 7,7$, 1,5, C^{13}H), 7,18 (1H, dd, $J = 7,7$, 1,3, C^{15}H), 7,53 (1H, s, C^8H), $^{13}\text{C-NMR}$, δ ppm: 21,54 (C21), 23,16 (C17,18), 43,09 (C9), 47,70 (C16), 50,57 (C19), 69,17 (20), 114,42 (C5), 117,00 (C12), 119,29 (C14), 122,76 (C10), 129,93 (C13), 131,16 (C15), 136,02 (C8), 145,79 (C11), 150,20 (C4), 154,06 (C6), 158,68 (C2).

45 (R)-1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol Reakční podmínky: 155 °C, 2 h. Kapalinová chromatografie 1,5% MeOH v CHCl_3 ; rekrystalizace z abs. CHCl_3 ; tt 169 až 175 °C. $^1\text{H-NMR}$, δ ppm: 1,26 (3H, d, $J = 6,7$, C^{21}H), 1,55 (6H, d, $J = 6,8$, $\text{C}^{17,18}\text{H}$), 3,41 (1H, m, C^{19}H_a), 3,55 (1H, m, C^{19}H_b), 4,07 (1H, quiqui, $J = 6,8$, 2,6, C^{20}H), 4,60 (1H, bs, O^{20}H), 4,64 (1H, sep, $J = 6,8$, C^{16}H), 4,68 (2H, bs, N^{11}H), 4,79 (2H, bs, C^9H), 6,08 (1H, bs, N^2H), 6,60 (1H, bs, N^6H), 6,68 (1H, dd, $J = 7,8$, 1,1, C^{12}H), 6,74 (1H, tt, $J = 7,5$, 1,1, C^{14}H), 7,12 (1H, tt, $J = 7,7$, 1,5, C^{13}H), 7,18 (1H, dd, $J = 7,7$, 1,3, C^{15}H), 7,53 (1H, s, C^8H), $^{13}\text{C-NMR}$, δ ppm: 21,54 (C21), 23,16 (C17,18), 43,09 (C9), 47,70 (C16), 50,57 (C19), 69,17 (20), 114,42

(C5), 117,00 (C12), 119,29 (C14), 122,76 (C10), 129,93 (C13), 131,16 (C15), 136,02 (C8), 145,79 (C11), 150,20 (C4), 154,06 (C6), 158,68 (C2).

(*RS*)-2-[(6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9-*H*-purin-2-yl)amino]butan-1-ol Reakční podmínky: 160 °C, 6 h. Kapalinová chromatografie 1,5% MeOH v CHCl₃; rekrystalizace z abs.

5 CHCl₃/ abs. Et₂O; tt 152 až 156 °C. ¹H-NMR, δ ppm: 1,04 (3H, t, J = 7,3, C²²H), 1,53 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 1,63 (2H, m, C²¹H), 3,66 (1H, m, C²⁰H_a), 3,83 (1H, dd, J = 11,0, 2,6, C²⁰H_b), 3,96 (1H, qui, J = 6,8, C¹⁹H), 4,58 (2H, bs, N¹¹H), 4,58 (1H, bs, O²⁰H), 4,59 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,73 (2H, bs, C⁹H), 5,33 (1H, bs, N²H), 6,47 (1H, bs, N⁶H), 6,65 (1H, dd, J = 7,6, 1,1, C¹²H), 6,71 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), 7,10 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,14 (1H, dd, J = 7,7, 1,3, C¹⁵H), 7,44 (1H, s, C⁸H), ¹³C-NMR, δ ppm: 11,55 (C22), 23,12 (C17), 23,18 (C18), 25,57 (C21), 42,72 (C9), 47,40 (C16), 56,88 (C19), 68,22 (C20), 114,91 (C5), 116,62 (C12), 118,90 (C14), 123,04 (C10), 129,76 (C13), 131,15 (C15), 135,66 (C8), 146,09 (C11), 150,59 (C4), 154,87 (C6), 159,54 (C2).

(*R*)-2-[(6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9-*H*-purin-2-yl)amino]butan-1-ol

15 Reakční podmínky: 160 °C, 6 h. Kapalinová chromatografie 1,5% MeOH v CHCl₃; rekrystalizace z abs. CHCl₃/ abs. Et₂O; tt 149 až 151 °C. ¹H-NMR, δ ppm: 1,04 (3H, t, J = 7,3, C²²H), 1,53 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 1,62 (2H, m, C²¹H), 3,66 (1H, m, C²⁰H), 3,83 (1H, dd, J = 11,0, 2,6, C²⁰H_b), 3,96 (1H, qui, J = 6,8, C¹⁹H), 4,56 (2H, bs, N¹¹H), 4,58 (1H, bs, O²⁰H), 4,59 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,73 (2H, bs, C⁹H), 5,33 (1H, bs, N²H), 6,46 (1H, bs, N⁶H), 6,65 (1H, dd, J = 7,7, 1,1, C¹²H), 6,71 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), 7,10 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,14 (1H, dd, J = 7,7, 1,3, C¹⁵H), 7,44 (1H, s, C⁸H), ¹³C-NMR, δ ppm: 11,55 (C22), 23,12 (C17), 23,18 (C18), 25,57 (C21), 42,72 (C9), 47,40 (C16), 56,88 (C19), 68,22 (C20), 114,91 (C5), 116,62 (C12), 118,90 (C14), 123,04 (C10), 129,76 (C13), 131,15 (C15), 135,66 (C8), 146,09 (C11), 150,59 (C4), 154,87 (C6), 159,54 (C2).

25 (*E/Z*)-*N*-2-(2-aminocyklohexyl)-*N*-6-(2-aminobenzyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin

Reakční podmínky: 160 °C, 4 h. Kapalinová chromatografie postupně 1, 2, 3, 4, 5 % MeOH v CHCl₃, 0,1% koncentrovaného NH₄OH.; amorfni látka. ¹H-NMR, δ ppm: 1,27 (3H, m, C²²H, C²⁴H_a), 1,51 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 1,70 (3H, m, C²³H, C²¹H_b), 2,08 (1H, d, J = 10,8, C²⁴H_b), 2,16 (1H, d, J = 10,0, C²¹H_b), 3,70 (1H, m, C²⁰H), 4,27 (1H, m, C¹⁹H), 4,64 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,72 (2H, bs, C⁹H), 4,76 (2H, bs, N¹¹H), 4,82 (2H, bs, N²⁰H), 5,13 (1H, bs, N²H), 6,17 (1H, bs, N⁶H), 6,65 (1H, dd, J = 7,7, 1,1, C¹²H), 6,68 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), ¹³C-NMR, δ ppm: 22,74 (C22), 23,33 (C17,18), 25,42 (C24), 29,72 (C21), 33,39 (C23), 42,40 (C9), 46,94 (C16), 52,11 (C19), 57,14 (C20), 115,33 (C5), 116,56 (C14), 118,76 (C14), 123,67 (C10), 129,47 (C13), 130,99 (C15), 135,51 (C8), 145,09 (C11), 151,62 (C4), 155,40 (C6), 159,96 (C2).

35 (*Z*)-*N*-2-(2-aminocyklohexyl)-*N*-6-(2-aminobenzyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin

Reakční podmínky: 160 °C, 4 h. Kapalinová chromatografie postupně 1, 2, 3, 4, 5 % MeOH v CHCl₃, 0,1% koncentrovaného NH₄OH.; amorfni látka. ¹H-NMR, δ ppm: 1,27 (3H, m, C²²H, C²⁴H_a), 1,51 (6H, d, J = 6,7, C^{17,18}H), 1,70 (3H, m, C²³H, C²¹H_b), 2,08 (1H, d, J = 10,6, C²⁴H_b), 2,16 (1H, d, J = 10,1, C²¹H_b), 3,70 (1H, m, C²⁰H), 4,27 (1H, m, C¹⁹H), 4,64 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,72 (2H, bs, C⁹H), 4,76 (2H, bs, N¹¹H), 4,83 (2H, bs, N²⁰H), 5,13 (1H, bs, N²H), 6,17 (1H, bs, N⁶H), 6,65 (1H, dd, J = 7,7, 1,1, C¹²H), 6,68 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), 7,06 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,5 C¹⁵H), 7,48 (1H, s, C⁸H).

(*E*)-*N*-2-(2-aminocyklohexyl)-*N*-6-(2-aminobenzyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin

45 Reakční podmínky: 160 °C, 4 h. Kapalinová chromatografie postupně 1, 2, 3, 4, 5 % MeOH v CHCl₃, 0,1% koncentrovaného NH₄OH.; amorfni látka. ¹H-NMR, δ ppm: 1,27 (3H, m, C²²H, C²⁴H_a), 1,51 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 1,70 (3H, m, C²³H, C²¹H_b), 2,08 (1H, d, J = 10,6, C²⁴H_b), 2,16 (1H, d, J = 10,2, C²¹H_b), 3,70 (1H, m, C²⁰H), 4,27 (1H, m, C¹⁹H), 4,64 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,72 (2H, bs, C⁹H), 4,76 (2H, bs, N¹¹H), 4,83 (2H, bs, N²⁰H), 5,13 (1H, bs, N²H), 6,17 (1H, bs, N⁶H), 6,65 (1H, dd, J = 7,7, 1,1, C¹²H), 6,68 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), 7,06 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,5 C¹⁵H), 7,48 (1H, s, C⁸H).

(*E*)-*N*-2-(4-aminocyklohexyl)-*N*-6-(2-aminobenzyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin

Reakční podmínky: 160 °C, 4 h. Kapalinová chromatografie postupně 1, 2, 3, 4, 5 % MeOH v CHCl₃, 0,1% koncentrovaného NH₄OH.; amorfni látka. ¹H-NMR, δ ppm: 0,85 (2H, m, C^{21,23}H_{aa}), 1,27 (2H, m, C^{21,23}H_{bb}), 1,54 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 2,08 (2H, d, J = 11,0, C^{20,24}H_{aa}), 2,22 (2H, d, J = 11,0, C^{20,24}H_{bb}), 3,70 (1H, m, C¹⁹H), 3,84 (1H, m, C²²H), 4,64 (1H, sep. J = 6,8, C¹⁶H), 4,68 (2H, bs, N¹¹H), 4,71 (2H, s, C⁹H), 4,72 (2H, bs, N²²H), 5,85 (1H, bs, N²H), 6,30 (1H, bs, N⁶H), 6,67 (1H, dd, J = 7,7, 1,1, C¹²H), 6,71 (1H, tt, J = 7,7, 1,3, C¹⁴H), 7,10 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,15 (1H, dd, J = 7,7, 1,5 C¹⁵H), 7,48 (1H, s, C⁸H), ¹³C-NMR, δ ppm: 23,31 (C16,17), 30,41 (C20,24), 33,84 (C21,23), 42,35 (C9), 46,93 (C16), 51,02 (C22), 64,36 (C19), 115,10 (C5), 116,41 (C12), 118,76 (C14), 123,63 (C10), 129,62 (C13), 131,15 (C15), 135,31 (C8), 146,21 (C11), 151,85 (C4), 155,48 (C6), 159,43 (C2).

N-2-(4-methoxybenzyl)-*N*-6-(2-aminobenzyl)-9-isopropyl-9*H*-purin-2,6-diamin

Reakční podmínky: 160 °C, 1 h. Kapalinová chromatografie postupně 1, 2 % MeOH v CHCl₃; rekrytalizace z abs. Et₂O; tt 90 až 112 °C. ¹H-NMR, δ ppm: 1,53 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 3,81 (3H, s, C²⁵H), 4,61 (2H, d, J = 5,7, N¹¹H), 4,65 (1H, sep, J = 6,8, C¹⁶H), 4,74 (2H, d, J = 5,9, C⁹H), 5,54 (1H, bs, N²H), 6,31 (1H, t, J = 7,1, N⁶H), 6,62 (1H, dd, J = 7,7, 1,5, C¹²H), 6,69 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹⁴H), 6,88 (2H, dd, J = 8,6, 2,0, C^{20,24}H), 7,09 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,11 (1H, dd, J = 7,7, 1,5, C¹⁵H), 7,33 (2H, dd, J = 8,4, 1,7, C^{21,23}H), 7,42 (1H, s, C⁸H), ¹³C-NMR, δ ppm: 23,18 (C17,18), 42,62 (C9), 47,24 (C16), 55,98 (C25), 114,56 (C20,24), 114,93 (C5), 116,41 (C12), 118,64 (C14), 123,22 (C10), 129,54 (C21,23), 129,68 (C13), 131,20 (C15), 132,62 (C19), 135,64 (C8), 146,27 (C11), 151,25 (C4), 154,93 (C6), 158,96 (C2), 159,43 (C22).

(E)-4-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl}amino)cyclohexanol Reakční podmínky: 160 °C, 20 h. Kapalinová chromatografie 1,5% MeOH v CHCl₃; amorfni látka. ¹H-NMR, δ ppm: 0,85 (2H, m, C^{21,23}H_{aa}), 1,39 (2H, m, C^{21,23}H_{bb}), 1,56 (6H, d, J = 6,8, C^{17,18}H), 2,04 (2H, m, C^{20,24}H_{aa}), 2,17 (2H, m, C^{20,24}H_{bb}), 3,70 (1H, m, C¹⁹H), 3,80 (1H, bs, O²²H), 3,85 (1H, m, C²²H), 4,65 (2H, bs, N¹¹H), 4,66 (1H, sep, J = 6,8, C¹⁶H), 4,82 (2H, bs, C⁹H), 5,76 (1H, bs, N²H), 6,56 (1H, bs, N⁶H), 6,67 (1H, dd, J = 7,9, 1,1, C¹²H), 6,73 (1H, tt, J = 7,5, 1,1, C¹⁴H), 7,12 (1H, tt, J = 7,7, 1,5, C¹³H), 7,17 (1H, dd, J = 7,7, 1,5, C¹⁵H), 7,50 (1H, s, C⁸H), ¹³C-NMR, δ ppm: 23,20 (C17,18), 31,22 (C21,23), 34,54 (C20,24), 43,24 (C9), 47,65 (C16), 50,42 (C22), 70,48 (C19), 114,12 (C5), 116,77 (C12), 119,06 (C14), 122,64 (C10), 129,92 (C13), 131,09 (C15), 136,00 (C8), 146,09 (C11), 151,49 (C4), 156,63 (C6), 158,82 (C2).

Tabulka 1: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)-ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
1	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	62,3/7,1/30,6	365,5	367,5
2	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	62,3/7,1/30,6	365,5	367,5
5	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	59,8/6,8/28,7	340,4	342,4
7	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	60,8/7,1/27,6	354,4	356,4
8	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	59,8/6,8/28,7	340,4	342,4
46	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	methyl	60,6/7,1/28,3	395,5	397,5

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Tabulka 2: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)- ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] ⁺ a)	[M+H] ⁺ b)
59	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	63.1/7.4/29.4	379.5	381.5
62	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	60.8/7.1/27.6	354.4	356.4
64	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	61.8/7.4/26.5	368.5	370.5

5

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

10 Tabulka 3: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)- ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] a)	[M+H] ⁺ b)
101	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	63,9/7,7/28,4	393,5	395,5
102	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	63,9/7,7/28,4	393,5	395,5
103	4-hydroxycyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	63,8/7,4/24,8	394,5	396,5
104	2-hydroxypropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	60,8/7,1/27,6	354,4	356,4
105	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	61,8/7,4/26,5	368,5	370,5
107	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	62,6/7,6/25,6	382,5	384,5
108	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	61,8/7,4/26,5	368,5	370,5
114	2-hydroxy-1-ethylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	62,6/7,6/25,6	382,5	384,5
115	2-aminocyklohexylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	63,4/7,9/24,6	396,5	398,5
116	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	63,4/7,9/24,6	396,5	398,5
118	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	56,5/6,5/24,3	402,9	404,9
125	2-aminocyklohexylamino	(2-amino-5-fluorbenzyl)amino	isopropyl	61,1/7,1/27,2	411,5	413,5
128	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-fluorbenzyl)amino	isopropyl	58,9/6,8/25,3	386,5	388,5
138	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methylbenzyl)amino	isopropyl	64,7/7,9/27,4	407,5	409,5
161	4-aminocyklohexylamino	(2,5-diaminobenzyl)amino	isopropyl	61,6/7,6/30,8	408,5	410,5
166	2-hydroxypropylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	isopropyl	59,2/7,1/25,4	384,5	386,5
182	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-methoxybenzyl)amino	isopropyl	60,1/7,3/24,5	398,5	400,5

15

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Tabulka 4: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)- ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
184	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	63,9/7,7/28,4	393,5	395,5
187	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	61,8/7,4/26,5	368,5	370,5

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Tabulka 5: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)- ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
195	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	66,3/7,9/25,8	433,6	435,6
198	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	64,5/7,6/23,9	408,5	410,5
209	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	cyklohexyl	59,5/6,8/22,1	443,0	445,0
226	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	cyklohexyl	62,8/7,6/22,3	438,6	440,6

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Tabulka 6: Látky připravené způsobem podle příkladu 2

No	PURINOVÝ SUBSTITUENT			CHN ANALÝZA	MS (ZMD)- ANALÝZA	
	C2	C6	C9	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
231	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	67,8/6,8/25,3	441,6	443,6
234	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	66,2/6,5/23,5	416,5	418,5
247	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	benzyl	61,1/5,8/21,7	451,0	453,0

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Příklad 3

CDK inhibiční testy

Vybrané sloučeniny byly testovány na CDK1/cyklin B, CDK2/cyklin E a CDK9/cyklin T inhibiční aktivitu s cílem zjistit základní vztahy mezi jejich strukturou a inhibiční aktivitou. CDK/-cyklin komplexy byly produkovány v Sf9 hmyzích buňkách koinfikovaných příslušným bakulovirovým konstruktem. Buňky byly sebrány 70 h po infekci do lyzačního pufru (50 mM Tris, 7,4 pH, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM NaF, 1% Tween 20, proteázové inhibitory) po

dobu 30 min na ledu a rozpustná frakce byla získána centrifugací při 14 000 g po dobu 10 min. Proteinový extrakt byl do doby použití skladován při -80°C . Závěrečný testovací systém pro měření kinázové aktivity byl použit v souvislosti s experimenty s určením kinetiky s lineárními parametry. Testovací směs obsahovala 1 mg/ml histonu (Sigma Type III-S), 15 μM ATP, 0,2 μCi [γ - ^{32}P] ATP a testované sloučeniny ve finálním objemu 20 μl , vše v reakčním pufru: 50 mM Hepes 7,4 pH, 10 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 10 mM 2-glycerolfosfátu, 1 mM NaF, 1 mM DTT a proteázové inhibitory. Po 10 min byla inkubace zastavena přidáním SDS pufru a proteiny byly separovány pomocí 12,5% SDS-PAGE. Měření kinázové inhibice bylo prováděno na digitálním imaging analyzeru BAS 1800. Kinázová aktivita byla vyjádřena jako procento maximální aktivity a hodnota IC_{50} byla vypočtena pomocí grafické analýzy. Kinázová aktivita je vyjádřena jako procento maximální aktivity a příslušná inhibiční konstanta byla stanovena grafickou analýzou z křivek závislosti odpovědi na dávce.

Tabulka 7: Kinázová inhibiční aktivita vybraných nových sloučenin

Č.	PURINOVÝ SUBSTITUENT			IC ₅₀ (μM)		
	C2	C6	C9	CDK1	CDK2	CDK9
OC	2-hydroxyethylamino	benzylamino	methyl	7	4	5
RO	(1-hydroxymethyl)propylamino	benzylamino	isopropyl	2,7	0,84	0,72
1	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	1,1	0,8	0,05
2	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	0,7	0,4	0,01
5	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	0,09	0,03	0,004
7	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	0,04	0,01	0,001
8	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	0,04	0,02	0,001
46	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	methyl	0,5	0,3	0,05
59	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	0,6	0,2	0,04
62	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	0,07	0,01	0,0007
64	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	0,03	0,01	0,0009
101	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,6	0,4	0,02
102	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,1	0,08	0,004
103	4-hydroxycyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,2	0,15	0,003
104	2-hydroxypropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,09	0,03	0,006
105	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,09	0,03	0,005
107	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,05	0,04	0,002
108	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,02	0,008	0,0004
114	2-hydroxy-1-ethylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	0,05	0,01	0,0008
116	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	0,08	0,04	0,005
118	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	0,08	0,01	0,002
128	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-fluorbenzyl)amino	isopropyl	0,07	0,008	0,0009
138	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methylbenzyl)amino	isopropyl	0,1	0,07	0,0006
161	4-aminocyklohexylamino	(2,5-diaminobenzyl)amino	isopropyl	0,9	0,6	0,08
166	2-hydroxypropylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	isopropyl	0,4	0,1	0,002
182	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-methoxybenzyl)amino	isopropyl	0,2	0,1	0,001
184	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	0,4	0,2	0,0009
187	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	0,2	0,1	0,0007
195	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	0,6	0,3	0,05
198	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	0,4	0,1	0,03
209	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	cyklohexyl	0,5	0,3	0,04
226	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	cyklohexyl	0,7	0,3	0,02
231	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	0,8	0,5	0,05
234	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	0,7	0,4	0,03
247	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	benzyl	0,8	0,6	0,07

5

OC: olomoucín + RO: roskovitín = sloučeniny známé z dosavadní techniky.

Tabulka 7 ukazuje výsledky inhibiční aktivity nových sloučenin vůči CDK9 v porovnání s CDK1 a CDK2 a daty prototypových sloučenin (trisubstituované puriny olomoucín a roskovitín). Většina derivátů vykazovala zvýšenou inhibiční aktivitu v *in vitro* kinázových testech. Modifikace benzenového kruhu amino skupinou v *ortho*-poloze vedla k nárůstu CDK9 inhibiční aktivity testovaných sloučenin a proto mohou být tyto látky považovány za specifické inhibitory CDK9.

Příklad 4

In vitro cyklotoxická aktivita nových derivátů

Používali jsme následující buněčné linie: Lidská T-lymfoblastická leukemická buněčná linie CEM, promyelocytární HL-60 a monocytární U937 leukemie, buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, buňky cervikálního karcinomu HELA, myší fibroblasty NIH3T3, lidská erythroleukemie K562, buňky G361 lidského maligního melanomu byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm² plastických lahvích a pěstovány v médiu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10% fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný), sloučeniny byly připraveny podle postupu podle předloženého vynálezu.

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (10⁴ buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), pipetovalo se 80 µl buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20µl alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v čtyřnásobné ředící řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 µM, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v dubletu. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100% vlhkosti a v atmosféře CO₂. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluoroskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (The tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $GI_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}} / FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota GI_{50} , která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek.

Cytotoxicita nových sloučenin byla testována na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 8). Vyšší aktivity byly nalezeny u všech testovaných nádorových buněčných linií oproti kontrolním (normální buňky). Významně vyšší účinnost nových derivátů byla nalezena u buněčných linií nesoucích různé mutace nebo delece v proteinech zapojených do regulace buněčného cyklu, např. HL-60, CEM, K-562, HeLa, HOS, a G-361. To naznačuje, že tyto látky by mohly být adekvátně účinné pro nádory s různými alteracemi nádorových supresorových genů, např. p53, Rb, atd.

Tabulka 8: Cytotoxita nových sloučenin pro různé nádorové buňky

Látka č.	IC ₅₀ (μM)					HeLa		
	MCF7	K-562	HOS	G361	CEM	HL60	HeLa	BJ
OC	132	>167	142	161	62	123	108	>167
RO	14	52	24	22	14	35	22	>167
1	13	46	22	22	15	31	18	>167
2	10	36	20	14	9	22	12	>167
5	2	6	4	3	3	8	2	>167
7	1,5	5	0,8	1,2	0,9	2,4	1,0	>167
8	1,8	3,4	1,1	1,7	0,6	2,8	1,3	>167
46	13	27	19	13	13	28	18	>167
59	14	31	17	15	10	29	20	>167
62	1,8	5,4	3,2	2,5	2,4	6,7	1,6	>167
64	1,3	4,5	0,9	1,0	0,7	2,1	1,2	>167
101	15,3	27	25	14	7	24	15	>167
102	5,5	20	44	17	9	32	16	>167
103	10,1	29,8	63	33	14	36	18	>167
104	15,4	26	31	19	17	29	15	>167
105	3,4	12,8	11	8	4,5	6,7	2,5	>167
107	5,9	15,4	22	11,5	4,3	18	6,5	>167
108	1,2	3,0	1,0	1,9	0,5	2,2	1,0	>167
114	11	28	19	15	17	34	17	>167
116	4,5	14	23	10	6,7	22	8,7	>167
118	1,8	8,4	7,6	6	3,2	5,4	1,6	>167
128	2,9	10,2	10,8	12	6,2	8,5	3,2	>167
138	3,8	9,5	25	13	8,7	23	9,2	>167
161	7	18	26	14	9	26	12	>167
166	17	24	32	17	13	31	16	>167
182	3,1	21	11	15	7,3	18	4,2	>167
184	8	24	32	19	11	35	17	>167
187	4,3	16	12	9	7,6	8,3	4,5	>167
195	12	38	22	14	11	24	13	>167
198	9	22	16	11	10	26	14	>167
209	11	25	18	14	12	31	14	>167
226	14	36	16	12	21	33	21	>167
231	15	37	23	15	12	32	16	>167
234	11	25	17	18	16	33	18	>167
247	14	41	22	21	15	34	19	>167

Příklad 5

Inhibice CDK9 a RNA polymerázy II

- 5 **Imunoblotting.** Buňky byly odděleny s pomocí gumového kusu a promyty 3–krát ledově chladným PBS a lyzovány v pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1% Nonidet P40) obsahujícím směs proteázových a fosfatázových inhibitorů (Sigma–Aldrich St Louis, Missouri, USA). 20 μg celkových proteinů bylo separováno pomocí
- 10 SDS–polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS–PAGE) v 8 nebo 10% gelu a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Membrány byly blokovány v 5% mléku a 0,1% Tweenu 20 v PBS a inkubovány přes noc se specifickými monoklonálními protilátkami nebo králičími polyklonálními séry. Primární protilátky specifické pro RNA polymerázu II (od Santa Cruz Biotechnology, California, USA) zahrnovaly: (i) N–20 použita v ředění 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (ii) H14, specifická pro formu fosforylovanou na fosfoserinu 5, ředění 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a (iii) H5, specifická pro formu fosforylovanou na fosfoserinu 2, ředění 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Další použité primární mAb v imunoblotech zahrnují (iv) anti–p53 (DO–1, vlastní) použita v ředění 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (v) anti–p21^{WAF1} (118, vlastní),) použita v ředění 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (vi) anti–actin (A–2066, Sigma–Aldrich St Louis, Missouri, USA) použita v ředění 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (vii) anti–T–antigen (419, vlastní), použita v ředění 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Všechny primární protilátky
- 20 byly naředěny v PBS obsahujícím 5% práškové mléko; 0,1% Tween 20. Peroxidázou konjugovaná králičí anti–myši imunoglobulin nebo prasečí anti–králičí antiséra (DAKO, Glostrup, Denmark) byly použity jako sekundární protilátky a vizualizovány ECI reagensii (Amersham–Pharmacia, Little Chalfont, UK).
- 25 **Fosforylace C–terminální domény RNA polymerázy II.** Modulace exprese z HIV promotoru po ošetření CDKI může být zprostředkováno transkripční regulací. U C–konce velké podjednotky RNA Pol II se nachází důležitá regulační doména, která se nazývá CTD (C–terminální doména). Studovali jsme proto účinek nových CDKI na fosforylaci CTD na serinu 2 a serinu 5. Hladiny fosforylace serinu 2 a serinu 5 v buňkách ošetřených COS–1, CV–1 a MCF–7 sloučeninou **105**
- 30 byly značně redukovány při všech testovacích podmínkách (Obr. 2). Ačkoliv byly funkce CDK a RNA polymerázy II suprimovány, jejich exprese z inkorporovaných virálních promotorů byla zvýšená. Tato pozorování podporují tvrzení, že mechanismy působení těchto CDKI na expresi z HIV promotoru souvisí s transkripční kontrolou a vykazují rozdílné efekty v závislosti na tom, jestli byl targetovaný promotor udržován jako extrachromozomální element nebo integrován do
- 35 buněčného genomu.

Příklad 6

- 40 Indukce nádorového supresoru p53 v nádorových buňkách

Buněčné kultury a ošetření. Buněčné linie odvozené z lidského cervikálního karcinomu (HeLa), lidského karcinomu prsu (MCF–7, BT549 a BR474), lidského osteosarkomu (HOS), lidského karcinomu tlustého střeva (HT29), myších fibroblastů (T221acZ) a lidského melanomu (Arn8)

45 byly kultivovány v Dulbecco Modified Eagle Mediu (DMEM) doplněném 10% fetálním bovinním sérem. Testované sloučeniny byly přidány z 50mM zásobního roztoku v dimethylsulfoxidu (DMSO) do kultivačního média ve finální koncentraci 20 μM . Kontrolní buňky dostaly pouze ekvivalentní objem DMSO.

- 50 *Analýza p53–dependentní transkripční aktivity.* β –galaktosidázová aktivita v lidské melanomové buněčné linii Arn8 a buněčné linii myších fibroblastů T221acZ (obě stabilně transfekované p53–responzivním reporterovým konstruktem pRGC Δ foslacZ) (Freburg et al., Cancer Res., 52, 1992–6976) byla stanovena. Pro stanovení celkové β –galaktosidázové aktivity byly buňky lyzovány 3

cykly zmrazení–tání v 0,25 M Tris pH 7,5 a lyzáty byly testovány jak popsáno Sambrookem et al. (Mol. Cloning, New York, 1989). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 9.

Protilátky

(a) Monoklonální protilátky DO–1, DO–2 a 1801 rozpoznávají N–terminální oblast proteinu p53, monoklonální protilátky DO–11 a DO–12 rozpoznávají rozdílné epitopy v hlavní doméně p53 proteinu, monoklonální protilátky Bp53–10 a Pba421 rozpoznávají C–terminální oblast p53 proteinu.

(b) Monoklonální protilátka 118 rozpoznává p21^{WAF1}.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza a imunobloting. Pro přímý imunobloting byly připraveny celkové lyzáty buněčných proteinů sesbíráním proteinů do horkého Laemmli elektroforetického vzorkovacího pufru. Proteiny byly poté rozděleny SDS–polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS–PAGE) na 10% gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu do Bio.Rad Mini Trans–Blott Electrophoretic Transfer Cell na 2 h při 4 °C a 150 mA v transferovém pufru (240 mM Tris, 190 mM glycín a 20% methanol). Označené markery molekulární hmotnosti (Bio–Rad) běžely paralelně. Blotované membrány byly zablokovány v 5% mléku a 0,1% Tweenu 20 v PBS po dobu 2 h a inkubovány přes noc s monoklonálními protilátkami. Po 3–násobném promytí v PBS plus 0,1% Tweenu 20, bylo jako sekundární protilátka použito peroxidázou konjugované králičí anti–myši imunoglobulinové antiserum (Dako, Denmark) naředěné 1:1000. K vizualizaci peroxidázové aktivity byly použity ECL reagentie od AMERSHAM podle návodu výrobce.

Transfekční experimenty. Buněčná linie MCF7–DDp53 byla odvozena z parenterální buněčné linie MCF–7 stabilní transfekcí plazmidem pCMVneonDDp53 kódující dominantně negativní zkrácený myši p53 protein obsahující aminokyselinová residua 1–14 a 302–390 pod kontrolou CMV promotoru. Kontrolní buněčná linie MCF–7neo byla odvozena po transfekci buněk MCF–7 pCMVneo vektorem. Transfekce byly prováděny pomocí Effectene transfection reagent (QIAGEN, Germany) podle doporučení dodavatele. Stabilní transfektanty byly selektovány při koncentraci 2 mg/ml G418 sulfátu (Life Technologies). Expres Ddp53 miniproteinu v MCF–7Ddp53 byla prověřena pomocí imunoblotingu s Bp53–10 monoklonální protilátkou. Nezávislé izolované MCF–7Dp53 klony 9, 12 a 14 exprimující vysoké hladiny Ddp53 miniprotein a MCF–7–neo klonů 3, 4 a 7 byly dále používány.

Sloučenina 105 indukuje wild typ, ale ne mutantní p53 protein. Za prvé jsme stanovili příslušnou koncentraci sloučenin 103 a 105 pro naše experimenty. Buňky MCF–7 (wt p53) byly ošetřeny po dobu 12 h vzrůstajícími koncentracemi 105 v rozsahu od 1 do 100 µM a následně byla analyzována exprese proteinu p53 pomocí monoklonální protilátky DO–1 (Obr. 3A). Bylo prokázáno, že koncentrace 105 2 až 5 µM ovlivňuje hladinu p53 proteinu v těchto buňkách. Jak je ukázáno na Obr. 3C, hladina exprimovaného proteinu 5 µM 105 nebyla významně vyšší než hladina indukovaná 50 µM koncentrací a proto byla použita pro další experimenty. Za druhé, časové periody 6, 12 a 24 h byly zvoleny, neboť hladina proteinové exprese dosáhla stabilní hladiny.

Analýzovali jsme expresi proteinu p53 v buněčných liniích nádorů prsu MCF–7 (wt p53), BT549 (mut p53) a BT474 (mut p53), v buněčné linii kolorektálního karcinomu HT29 (mut p53) a v buněčné linii osteosarkomu HOS (mut p53). Ošetření buněk MCF–7 po dobu 6, 12 a 24 h s 5 µM 105 vedlo k signifikantní akumulaci wild–typu p53. Nulová indukce p53 byla pozorována po expozici buněčných linií BT549 a HOS s 5 µM 105 po dobu 6, 12 a 24 h, exprimujících mutantní p53. Nebyla pozorována žádná korelace mezi citlivostí buněčných linií k 105 a přítomností wild–typu nebo mutantního typu p53.

105–indukovaný wt p53 je transkripčně aktivní a zodpovědný za indukci p21^{WAF1}

Účinek **105** a příbuzných sloučenin na aktivaci proteinu p53 byl rovněž analyzován pomocí lidské melanomové buněčné linie Arn8 a myší fibroblastové buněčné linie T22LacZ exprimující β -galaktosidázu pod kontrolou p53 responzivního promotoru. Indukce wt p53 v těchto buňkách ošetřených 5 μ M **105** (6, 12 a 24 h) vedly k aktivaci responzivního promotoru a následně k expresi β -galaktosidázy. Arn8 a T22LacZ buňky ošetřené **105** byly zafixovány a zkoumány mikroskopicky na β -galaktosidázovou aktivitu za použití X-gal jako substrátu, což vedlo k barvení přibližně 25 % buněk modře ve srovnání s méně než 1 % modře-zabarvených buněk v DMSO-ošetřených kontrolních liniích (Obr. 3A). Celková β -galaktosidázová aktivita v Arn8 buňkách byla stanovena kolorimetrickým testem. Výsledky naznačují silnou aktivitu β -galaktosidázy 12 a 24 hodin po ošetření potvrzující přítomnost transkripčně aktivního proteinu p53 v porovnání s kontrolními buňkami ošetřenými DMSO.

Tato transkripční aktivita byla potvrzena analýzou exprese p21^{WAF1} v buňkách MCF-7. Indukce proteinu p53 byla průkazná již po 4 h od ošetření, avšak zvýšené hladiny proteinu p21^{WAF1} byly stabilně pozorovány až po 12 h od ošetření látkou **105** (Obr. 3B). Pouze buňky exprimující wt p53 odpovídaly na **105** indukci p21. V zájmu potvrzení indukce exprese p21^{WAF1} jako p53-responzivní byla připravena série stabilně transfekovaných klonů MCF-7 exprimujících vysoké hladiny dominantně-negativního Ddp53 miniproteinu. U tohoto proteinu obsahujícího aminokyseliny 1–14 a 302–390 ze sekvence myšího p53 bylo prokázáno, že se váže k C-terminální části wt p53 a abroguje p53-závislou transkripci. Kontrolní klony MCF-7neo byly připraveny stabilní transfekcí buněk MCF-7 s páteřním vektorem pCMVneo bez insertu. Klony exprimující vysoké hladiny Ddp53 stejně jako kontrolní klony byly ošetřeny sloučeninou **105** a testovány na expresi p21^{WAF1} pomocí imunoblotingu s p21^{WAF1} specifickými monoklonální protilátkou 118. Jako výsledek exprese Ddp53, přerušující p53 transkripční aktivitu, nebyla detekována žádná indukce p21^{WAF1} v MCF-7Ddp53 klonech.

Další sloučeniny měly efekt srovnatelný se **105**, avšak účinné koncentrace testovaných sloučenin indukující maximum β -galaktosidázové aktivity se vzájemně lišily. Výsledky jsou prezentovány v tabulce 9 jako koncentrace indukující maximální β -galaktosidázovou aktivitu. Zdá se, že substituované 6-(2-aminobenzylamino)puriny jsou účinnými induktory exprese wt p53.

Tabulka 9: Vliv vybraných substituovaných 6-(2-aminobenzylamino)purinů na indukci proteinů p53 a p21^{WAF1} v buňkách MCF-7 exprimujících wild-typ p53.

Č.	SUBSTITUENTY NA PURINU			Max. β -gal. aktivita
	C2	C6	C9	Konc. (μ M)
OC	2-hydroxyethylamino	benzylamino	methyl	125
RO	(1-hydroxymethyl)propylamino	benzylamino	isopropyl	50
1	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	34
2	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	37
5	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	29
7	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	25
8	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	methyl	24
46	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	methyl	32
59	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	33
62	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	7

64	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	ethyl	6
101	2-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	22
102	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	13
103	4-hydroxycyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	14
104	2-hydroxypropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	12
105	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	16
107	(1-hydroxymethyl-2-methyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	11
108	2-hydroxy-2-methylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	3
114	2-hydroxy-1-ethylpropylamino	(2-aminobenzyl)amino	isopropyl	3
116	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	21
118	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	isopropyl	18
128	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-fluorbenzyl)amino	isopropyl	4
138	4-aminocyklohexylamino	(2-amino-3-methylbenzyl)amino	isopropyl	2
161	4-aminocyklohexylamino	(2,5-diaminobenzyl)amino	isopropyl	20
166	2-hydroxypropylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	isopropyl	14
182	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-methoxybenzyl)amino	isopropyl	12
184	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	6
187	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	propyl	3
195	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	22
198	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	cyklohexyl	19
209	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	cyklohexyl	20
226	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-3-methoxybenzyl)amino	cyklohexyl	21
231	4-aminocyklohexylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	18
234	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-aminobenzyl)amino	benzyl	24
247	(1-hydroxymethyl)propylamino	(2-amino-5-chlorbenzyl)amino	benzyl	20

Příklad 7

5

In vivo protinádorová aktivita

Screening biologické aktivity sloučeniny **105** byl proveden na modelu přežití P388D1 leukémie transplantované intraperitoneálně s $2 \cdot 10^5$ buňkami. DBA-2 myši byly použity jako hostitelské. Jeden den po transplantaci leukémie bylo zahájeno ošetření sloučeninou **105**. Léčivo bylo podáno orálně gastrickou výživou v celkovém objemu 200 μ l/dávku 2-krát denně v dávce 250 mg/kg ve dvou chemoterapeutických cyklech (dny 1 až 3 a 7 až 9). Sloučenina **105** byla rozpuštěna v 5% N-methyl-2-pyrrolidinu, 30% polyethylenglykolu 400, 65% tartarovém pufru (pH 3,0). Analýza přežití ošetřených zvířat (10 myši/skupina) byl proveden v porovnání s ošetřením myši vehikulem za použití metody Kaplan-Meier a průkaznost byla zhodnocena pomocí log-rank testu. Tělesná váha experimentálních zvířat byl stanovována paralelně za účelem reflexe toxicity a účinnosti terapie. Komparativní analýzy tělesné váhy byly zhodnoceny pomocí ne-parametrického t-testu.

Výsledky našich analýz prokázaly, že sloučenina **105** redukuje váhu ošetřených zvířat, která je u modelu intraperitoneálně transplantované leukémie P388D1 indikativní jak pro toxicitu, tak pro účinnost léčby (redukce ascitů a tvorby intraperitoneálního tumoru). Analýza přežití ukázala statisticky významně lepší přežití myši ošetřených **105** ($P=0,0409$), které bylo převedeno do delšího

průměrného času přežití (15,4 dnů skupinu ošetřenou léčivem versus 13,9 dní skupinu ošetřenou vehikulem).

5 Detailnější analýza protinádorové aktivity **105** byla provedena na lidském xenograft modelu plicního adenokarcinomu A549 transplantovaného do CD-1 SCID myši. Zvířata byla transplantována subkutánně $2 \cdot 10^6$ A549 buněk do zadní části zad. Přibližně po měsíci se vytvořily u většiny zvířat zřetelné nádory a poté byla zahájena terapie. Léčivo bylo podáno orálně gastrickou výživou v celkovém objemu 200 μ l/dávku 2–krát denně v dávce 250 mg/kg ve dvou chemoterapeutických cyklech (dny 1 až 3 a 7 až 9). Sloučenina **105** byla rozpuštěna v 5% N-methyl-2-pyrrolidinu, 30% polyethylenglykolu 400, 65% tartarovém pufru (pH 3,0). Primární endpoint pro analýzu byla redukce objemu nádoru (10 myši/skupina), která byla kvantifikována posuvným měřítkem. Analýzy ošetřených zvířat byly prováděny v porovnání s myšmi ošetřenými vehikulem. Tělesná váha experimentálních zvířat byla stanovována paralelně za účelem reflexe toxicity a účinnosti terapie. Komparativní analýzy tělesné váhy byly zhodnoceny pomocí ne-parametrického t-testu.

Výsledky našich analýz prokázaly, že sloučenina **105** je dobře tolerována zvířaty. Byla prokázána pouze slabá redukce tělesné váhy, která byla pouze signifikantní v jednom časovém bodu (Den 52).

20 Analýza objemu nádorů prokázala signifikantně menší nádory u myši ošetřených sloučeninou **105** ($P=0,0409$), která se projevila i delším průměrným časem přežití (21,7 dnů skupinu ošetřenou léčivem versus 12,4 dní skupinu ošetřenou vehikulem).

25 Příklad 8

Antivirová aktivita

30 **Buněčné kultury.** Buněčná linie z ledvin afrického kočkodana CV-1 (wild-typ p53), COS-1 buňky (vytvořeny z CV-1 po transformaci z původně defektního mutanta SV40), buněčná linie lidského malobuněčného karcinomu plic H1299, buněčná linie lidského prsního adenokarcinomu MCF-7 (wild-typ p53) a buněčná linie lidského prsního karcinomu T47D (mutantní p53) byly udržovány v Dulbecco's modified Eagle médiu (DMEM) obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra, 300 μ g/ml L-glutaminu, 105 IU/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu. Lidské fetální fibroblasty předkožky (HFFF) (wild-type p53), lidské epitheliální buňky plicního karcinomu A549 (wild-typ p53), lidské B95a B buňky a psí epitheliální buňky Madin-Darby z ledvin (MDCK) byly pěstovány v DMEM doplněném 10% tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem, 105 IU/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu. Buňky byly pěstovány do 80% konfluence před experimentálním ošetřením. Jestli není jinak stanoveno, tak 20 μ M roskovitinu a 10 μ M **105** bylo přidáno k buňkám na dobu 12 hodin.

45 **Generace stabilních buněčných linií.** Plazmidy pCEP4-Tat a pHIV-lacZ byly získány z NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (Chang et al. Gene Ther. 6(5): 715–28, 1999). pCEP4-Tat obsahoval HIV-1SF2 tat, kdežto pHIV-lacZ obsahoval všechny U3 regiony, část R regionu (včetně TAR) a HIV-1,3'LTR řídící lacZ a pCMV-lacZ obsahující lacZ pod kontrolou promotoru z lidského cytomegaloviru. DNA transfekce probíhaly pomocí Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) podle návodu výrobce. Buněčná linie H1299-TAT byly odvozeny z buněk H1299 stabilně transfekovaných pCEP4-Tat. Buněčná linie H1299-HIV byly 50 připraveny stabilní kotransfekcí s pCEP4-Tat a pHIV-lacZ plazmidy. Dva dny po transfekci byly buňky selektovány na hygromycinu B (250 μ g/ml; Merck Biosciences, Nottingham, UK) za účelem generace stabilních klonů s inkorporovanou plazmidovou DNA. Selektované stabilně transfekované (i) H1299-TAT klony byly transientně transfekovány pHIV-lacZ a testovány na

β -galaktosidázovou aktivitu (viz níže), zatímco (ii) buňky H1299-HIV byly testovány na β -galaktosidázovou aktivitu bezprostředně po stabilní inkorporaci obou plazmidů.

Beta-galaktosidázový test. Pro měření β -galaktosidázové aktivity byly buňky sbírány 12 h po transfekci a rozrušeny sonikací v 0,25 M Tris-HCl pH 7,5. Buněčné lyzáty (100 μ g) byly smíchány s 3 μ l pufru (0,1 M $MgCl_2$, 4,5 M β -merkapt ethanol), 66 μ l ONPG (4 mg/ml o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid) v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru, pH 7,5. Reakce byla inkubována po dobu 30 minut při 37 °C, zastavena 500 μ l 1 M Na_2CO_3 a absorbance stanovena při 420 nm v mikroplate readeru.

Imunoblotting. Buňky byly odděleny pomocí gumového kusu a promyty 3-krát ledově chladným PBS a lyzovány v pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1% Nonidet P40) obsahujícím směs proteázových a fosfatázových inhibitorů (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA). 20 μ g celkových proteinů bylo separováno pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE) v 8 nebo 10% gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrány byly blokovány v 5% mléku a 0,1% Tweenu 20 v PBS a inkubovány polyklonálními séry. Primární protilátky specifické pro RNA polymerázu II (od Santa Cruz Biotechnology, California, USA) zahrnovaly: (i) N-20 použita v ředění 1 μ g/ml, (ii) H14, specifická pro formu fosforylovanou na fosfoserinu 5, ředění 6 μ g/ml a (iii) H5, specifická pro formu fosforylovanou na fosfoserinu 2, ředění 4 μ g/ml. Další použité primární mAb v imunoblotech zahrnují (iv) anti-p53 (DO-1, vlastní) použita v ředění 1 μ g/ml, (v) anti-p21^{WAF1} (118, vlastní),) použita v ředění 1 μ g/ml, (vi) anti-actin (A-2066, Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA)) použita v ředění 1 μ g/ml, (vii) anti-T-antigen (419, vlastní), použita v ředění 1 μ g/ml. Všechny primární protilátky byly naředěny v PBS obsahujícím 5% práškové mléko; 0,1% Tween 20. Peroxidázou konjugovaná králičí anti-myší imunoglobulin nebo prasečí anti-králičí antiséra (DAKO, Glostrup, Denmark) byla použita jako sekundární protilátky a vizualizována s ECL reagensii (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK).

Infekce a viry. Buněčné linie MCF-7 a T47D byly infikovány SV40 virem po dobu 4 hodin v bezpérovém DMEM. Po infekci byl DMEM doplněn 10% fetálním bovinním sérem a buď 20 μ M roskovitinu nebo 8 μ M 105 přidáními bezprostředně nebo 12 h po infekci. Infikované buňky byly sklizeny po 45 h. Byly použity herpes simplex virus typ 1 kmen 17 (HSV-1), HSV-1 kmen 17 obsahující GFP v lokusu thymidin kinázy (HSV-1-deltaTK) a HSV-2 kmen HG52 (HSV-2). Všechny herpesviry byly množeny a titrovány v HFFF buňkách. Virus vakcinie kmen WR kódující chřipku PB2 v TK lokusu (VV) byl množen a titrován v HFFF buňkách. Lidský adenovirus typ 4 (HAdV-4) kmen RI-6 byl množen a titrován v A549 buňkách. Lidský cytomegalovirus kmen Toledo kódující GFP v β 2.7 lokusu (HCMV) (McSharry et al., J. Gen. Virol. 2003, 84:2511-62003) byl množen a titrován v FFF buňkách. Virus spalniček (MV) wildtyp kmen Štrb byl dar od J. Schneidera Schaulies., Wuezburg, Germany. MV byl množen a titrován v B95a buňkách. Titr viru spalniček byl stanoven jako jednotky tvořící syncytium (SFU). Chřipkový virus (IV) H1N1 kmen A/PR/8/34, získaný z European Collection of Animal Cell Cultures (Porton Down, UK), byl množen v zárodečné kavitě embryonálních kuřecích vajec (kmen 0; Institute for Animal Health, Compton, UK) při 35 °C. Vejce byla infikována 6. den a zárodečná tekutina byla sbírána 10. den. IV titry byly stanoveny jako HA jednotky (HAU; inverzní hodnota log2 konečného ředícího titru) pomocí hemaglutinace kuřecích erythrocytů (Fiebig Naehrstofftechnik, Bad Kreuznach, Germany) a jako jednotky tvořící infekční centra (ICFU) na mililitr zárodečné tekutiny. ICFU byly stanoveny v MDCK buňkách rostoucích v 12 jamkových destičkách (NUNC, Roskilde, Denmark) na 16 mm skleněných krycích sklíčkách za použití koktailu přímých FITCem značených monoklonálních protilátek A typu chřipkového viru (K6105 A reagent, DAKO, Glostrup, Denmark).

Antivirové látky. Kde je naznačeno, tak byla využita následující virostatika: acyklovir (9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanin) (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA), cidofovir (S)-1-[3-hydroxy-2-(fosfonylmethoxy)propyl]-cytosin (Moravek, Biochemicals), jod-deoxyuridin (1-

(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-joduracil) (Sigma), ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboxamid) (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA), tamiflu (ethylester (3R,4R,5S)-4-acetylamino-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyklohexen-1-karboxylové kyseliny) (Roche), chloroquin (N'-(7-chlorochinolin-4-yl)-N,N-diethylpentan-1,4-diamin) (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA), roskovitin (2-(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin) byl připraven podle publikované metody (Havlíček et al., J. Med. Chem. 40: 408-412, 1997). Antivirotika byla použita jak je naznačeno v textu.

Test snížení počtu plaků (plaque number reduction assay). 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}) byly vypočteny za použití standardního testu snížení počtu plaků. IC_{50} byly definovány jako koncentrace antivirotika, která redukovala počet plaků o 50 % relativně k ošetření bez antivirotik. Buňky byly pěstovány v 25 cm² lahvičkách pro tkáňové kultury (Corning) až do konfluence a poté byly infikovány 100 jednotkami tvořícími plaky (PFU) příslušného viru (HSV-1 infekce na HFFF, HSV-1-deltaTK na HFFF, HSV-2 na HFFF, VV na HFFF, HAd4 na A549, HCMV na HFFF) po dobu 1 h při 37 °C v CO₂ inkubátoru na kolébající se platformě. Buňky byly poté převrstveny médiem obsahujícím 1% Avicel RC-591 (Camida Ltd) (Matrosovich et al., Virol. J. 3:63, 2006) a testovanou látkou. Sloučenina **105** a roskovitin byly typicky testovány v koncentračním rozsahu od 0,04 do 20 μ M. Kde bylo nezbytné, tak byl acyklovir, cidofovir, jod-deoxyuridin, chloroquin, tamiflu a ribavirin použity pro srovnání a byly aplikovány v rozmezí, které zahrnuje jejich vrcholovou hodnotu IC_{50} . Infikované buněčné monovrstvy byly barveny Giemsa barvením (Sigma) po dobu 3 dnů (pro HSV-1, HSV-1-deltaTK, HSV-2 & VV) nebo 5 dnů (HAd4) a plaky byly spočteny. U HCMV byly po 7 denní inkubaci buněčné monovrstvy promyty PBS a zelené fluorescenční foci byly spočteny pod Leica DMIRBE mikroskopem. Počet plaků byl vyneseno a analyzován pomocí Cricket Graph softwaru (Computer Associates).

K realizaci testu snížení MV syncytií (MV syncytium reduction assay) byly napěstovány buňky B95a ve 24 jamkových destičkách (NUNC, Roskilde, Denmark) do 80% konfluence. Buňky byly znovu preošetřeny médiem obsahujícím příslušné množství antivirotika po dobu 30 minut před infekcí. Každá jamka byla infikována 100 SFU MV a inkubována v DMEM bez FBS nebo antibiotik a neobsahovala rovněž žádná antivirotika nebo virotika ve zvoleném koncentračním rozsahu po dobu 24 h. Tvorba syncytií byla zhodnocena fázovým kontrastním mikroskopem. IC_{50} byla definována jako koncentrace antivirotika, která redukovala počet syncytií na 50 % v porovnání s buňkami infikovanými za nepřítomnosti antivirotika.

Testy snížení IV infekčních center (IV infectious center reduction assay) byly prováděny na buňkách MDCK rostoucích na 16 mm skleněných krycích sklíčkách ve 12 jamkových destičkách (NUNC, Roskilde, Denmark) do 80% konfluence. Buňky byly preošetřeny médiem obsahujícím testované antivirotikum po dobu 30 minut před infekcí. Každá jamka byla infikována 100 ICFU IV inkubovaného v DMEM bez FBS nebo antibiotik a buď neobsahovala antivirotika, nebo obsahovala antivirotika v příslušném koncentračním rozsahu po dobu 24 h. Buňky byly promyty PBS, fixovány 3% paraformaldehydem (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA), permeabilizovány 1% Tritonem X 100 (Sigma-Aldrich St Louis, Missouri, USA) v PBS a označeny koktejlem monoklonálních protilátek proti A typu viru chřipky (K6105 A reagent, DAKO, Glostrup, Denmark). Centra tvořící infekční jednotky (zelená fluorescenční cytoplasma anebo fluorescenční jádro) byla kvantifikována pomocí Axioplan epifluorescenčního mikroskopu s Axiovision softwarem (Carl Zeiss, Jena, Germany). IC_{50} byla definována jako koncentrace antivirotika redukující počet infekčních center o 50 % v porovnání s buňkami infikovanými v nepřítomnosti antivirotika. Konečné hodnoty IC_{50} pro všechny viry/antivirotické kombinace jsou vždy průměrem ze 4 nezávislých experimentů.

Test snížení produkce HAd4 (HAd4 yield reduction assay). Konfluentní monovrstvy buněk A549 v 6 jamkových tkáňových mikrodestičkách byly infikovány 2000 PFU/jamku HAd4 po dobu 1 h v 37 °C v CO₂ inkubátoru na kolébající se platformě. Buňky byly poté promyty a pěstovány v médiu obsahujícím 10 μ M sloučeniny **105** nebo 100 μ M cidofoviru nebo koktejlu 10 μ M sloučeniny **105** a 100 μ M cidofoviru. Buňky a media byla posbírána po 6, 12, 24, 48, 72 a 96 h

po infekci a poté byl výnos uvolněných virů a celkový výnos virů (uvolněný a intracelulární) v každém vzorku titrován pomocí buněk A549.

Inhibice virové replikace sloučeninou 105 a roskovitinem. Vzhledem ke zjištění, že sloučenina 105 byla mnohem účinnějším inhibítozem CDK aktivity než roskovitin, bylo velmi důležité zjistit relativní kapacitu těchto dvou CDKI snižovat virovou replikaci. S použitím testů redukce plaků byly porovnány účinky sloučeniny 105 na replikaci panelu DNA (HSV, VV, HAd4, HCMV) a RNA (MV, IV) virů v porovnání s řadou referenčních antivirových látek (Tab. 10). Sloučenina 105 inhibovala replikaci všech testovaných DNA virů mnohem efektivněji než roskovitin. Roskovitin neinhiboval jak HSV-1 či HSV-2, zatímco sloučenina 105 byla účinná, přestože vykazovala vyšší IC₅₀ než acyklovir. Acyklovir je proléčivo, které je aktivováno v buňce fosforylací virově kodovanou TK. HSV-1 deleční mutant thymidin kinázy (TK) zůstával citlivý pro sloučeninu 105 oproti acykloviru, což naznačuje, že sloučenina 105 působí rozdílným mechanismem (Tabulka 10). Přestože se hodnoty IC₅₀ pro HSV-1 a HSV-2 u acykloviru lišily, jejich hodnoty pro sloučeninu 105 byly podobné. Je velmi zajímavé, že všechny DNA viry byly inhibovány v přibližně srovnatelných koncentracích sloučeninou 105, což je konsistentní s molekulárním cílem tohoto léčiva, tedy CDK dříve než specifické virově-kódované funkce. Virus vakcinie byl inhibován stejně dobře jak sloučeninou 105, tak joddeoxyuridinem, zatímco roskovitin nevykazoval žádný významný účinek. Existují předpoklady, že replikace VV nevyžaduje fungování CDK, přičemž bylo dokonce předpokládáno, že CDKI nemusí být efektivní vůči takovýmto virům (Schang, J. Antimicrob. Chemother. 50(6):779–92, 2002). Naše výsledky však vůbec poprvé naznačují, že i poxvirus je citlivý k CDKI. Sloučenina 105 i roskovitin inhibovaly replikaci HAd4 a, co je ještě zajímavější, jejich hodnoty IC₅₀ byly výrazně nižší než u cidofoviru. Přestože byl HCMV přibližně stejně citlivý k sloučenině 105 a roskovitinu, v tomto případě při vyšších dávkách než cidofovir. Oba CDKI prokázaly nulovou účinnost k testovaným RNA virům, tedy MV a IV.

Tabulka 10: Inhibice virové replikace. IC₅₀ (μM) bylo stanoveno pomocí testu redukce plaků (n=4)

	<i>HSV-1</i>	<i>HSV-1</i> <i>ΔTK</i>	<i>HSV-2</i>	<i>VV</i>	<i>Had4</i>	<i>HCMV</i>	<i>MV</i>	<i>IV</i>
sloučenina 105	5,0 ± 0,9	5,3 ± 0,9	4,7 ± 1,0	3,8 ± 1,3	2,4 ± 1,3	3,2 ± 1,6	19,7 ± 1,8	> 20
roskovitin	> 20	> 20	> 20	> 20	3,1 ± 1,6	4,9 ± 2,2	> 20	> 20
joddeoxyuridin	*			3,7 ± 1,6				
acyklovir	0,5 ± 0,2	73,0 ± 18	2,2 ± 0,5					

<i>cidofovir</i>					$16,6 \pm 2,9$	$0,2 \pm 0,1$		
<i>ribavirin</i>					> 40		$12,0 \pm 1,1$	$10,5 \pm 1,8$
<i>tamiflu</i>								$12,5 \pm 2,2$
<i>chloroquin</i>								$5,3 \pm 0,9$
* hodnoty ve vystínovaných buňkách nebyly stanoveny								

Inhibice virové exprese sloučeninou **105** a roskovitinem. SV40 large T antigen je pleiotropický, kódující mnohočetné funkce, které regulují virovou infekci a podporují tumorigenezi. Large T-antigen tvoří stabilní komplex s p53, a tím, že podporuje defosforylaci pRb, inaktivuje členy Rb rodiny (Zalvide et al., Mol. Cell. Biol. 18(3):1408–15, 1998). Inaktivace p53 je kritická pro SV40-zprostředkovanou buněčnou transformaci, zatímco doprovodná destabilizace tohoto inhibičního komplexu mezi defosforylovaným Rb a členy E2F rodiny transkripčních faktorů usnadňuje transkripci cílových genů podporujících vstup do buněčného cyklu (Ali et al., J. Virol. 78(6): 2749–57, 2004).

Buňky MCF-7 (wild typ p53) a T47D (mutant p53) byly infikovány SV40 za účelem studia účinků sloučeniny **105** a roskovitinu na expresi large T-antigenu, p53 a p21^{WAF1}. Expresi large T antigenu byla detekována nezávisle na statusu p53, zatímco large T antigen-závislá vazba a stabilizace wild-typu p53 vedla k jeho inaktivaci. Ošetření infikovaných buněk sloučeninou **105** nebo roskovitinem vedlo k redukci hladiny large T-antigenu, což naznačuje esenciální úlohu CDK pro virovou genovou expresi (Obr. 8). Vliv těchto CDKI na buňky MCF-7 byl vyšší, když byly přidány bezprostředně po infekci, zejména u buněk ošetřených roskovitinem. Simultánně jsme pozorovali i inhibici hladiny p53 a obnovu jeho funkce representovanou transaktivací p53 cílového proteinu p21^{WAF1}. Inhibiční účinek sloučeniny **105** na expresi large T-antigenu v T47D buněčné linii byl nezávislý na času ošetření, zatímco roskovitin ovlivnil expresi T-antigenu pouze když byl podán 16 h po infekci. Hladina nutantního p53 zůstala nezměněna a nebyl schopen rovněž trans-aktivovat expresi p21^{WAF1} (Obr. 8).

Po provedení následných testů bylo prokázáno, že oba CDKI měly inhibiční vliv i na izolovaný virální promotor v plastidovém vektoru. Transientně jsme transfekovali buněčnou linii MCF-7 a T47D plazmidem pCMV-lacZ, ošetřili transferované buňky roskovitinem nebo sloučeninou **105** a změřili β -galaktosidázovou aktivitu. Jak sloučenina **105**, tak i roskovitin inhibovaly expresi z CMV promotoru v transientně transferovaných buňkách, kde sloučenina **105** vykazovala mnohem silnější supresivní účinek (Obr. 9).

Vliv CDKI na expresi SV40 promotoru inkorporovaného do buněčného genomu. Pozorování popsaná výše nás vedla k expanzi analýz účinků sloučeniny **105** a roskovitinu na genovou expresi SV40 v COS-1 buňkách, kde jsou sekvence kódující velký T-antigen integrovány do buněčného genomu. Buňky COS-1 jsou CV-1 buňkami transformovanými původně-defektivním

mutantem SV40, tedy CV-1 a buňky MCF-7 byly použity jako kontroly. Ačkoliv byla exprese z hlavního IE promotoru SV40 a CMV v obou případech inhibována CDKI, když byly introdukovány do extrachromosomálního elementu (Obr. 8 a 9), v buňkách COS-1 ošetřených sloučeninou **105** a roskovitinem stimulovaly expresi velkého T-antigenu, zatímco p53 zůstával konstantní a transkripčně inaktivní (p21^{WAF1} nebyl transaktivován). V kontrolních CV-1 a MCF-7 buňkách vzrostly hladiny p53 a p21^{WAF1} po ošetření oběma CDKI (Obr. 10). Tyto výsledky naznačují, že CDKI mohou mít jak inhibiční, tak stimulační vliv na virové promotory, a to v závislosti na jejich lokalizaci v buňce.

Inhibice exprese z HIV promotoru. Transkripce z HIV genomu je citlivá na aktivitu CDK9 a může být proto suprimována ošetřením CDKI v koncentračním rozmezí, které nesnižuje buněčnou transkripci (Chao et al., J. Biol. Chem. 2000 Sep 15;275(37): 28345–8, 2000). Kromě toho interaguje funkčně CDK9 s transaktivací doménou Tat, což je ilustrováno faktem, že CDK9 deplece blokuje Tat-dependentní transaktivaci a aktivitu.

Za účelem vyhnutí se obecné inhibici transkripce z extrachromosomální DNA vlivem CDKI byly zkonstruovány dvě stabilní buněčné linie (H1299-TAT a H1299-HIV). Buňky H1299-TAT byly transfekovány pomocí pHIV-lacZ a poté ošetřeny roskovitinem a sloučeninou **105**. Exprese z pHIV-lacZ (extrachromosální lokalizace) byla inhibována ošetřením CDKI; β -galaktosidázový (β -gal) výstup byl o něco nižší u sloučeniny **105** v porovnání s roskovitinem (Obr. 11). Je zajímavé, že účinky aplikace CDKI byly opačné při testování na HIV promotoru integrovaném do buněčné DNA (H1299-HIV buňky) s reportérovým výstupem zvýšeným 4-násobně po ošetření sloučeninou **105** a 2,5-krát zvýšeným po ošetření roskovitinem (obr. 11).

Inhibice replikace adenovirů sloučeninou **105 a cidofoviem.** Sloučenina **105** měla pronikavý vliv na replikaci HAdV4 s lepšími hodnotami IC50 než dokonce cidofovir v testu snížení plaků (Tab. 10). Vzhledem k tomu, že **105** a cidofovir účinkují rozdílnými mechanismy, tak jsme studovali, zda-li tato dvě antivirotika by mohla mít aditivní efekt, když budou zkombinována. Mnohostupňová růstová křivka HAd4 byla proto měřena v přítomnosti 10 μ M **105**, 100 μ M cidofoviru nebo obou (Obr. 13a). Jak bylo prováděno konvenčně s HAdV, testy měřily celkový výtěžek virů z kultury. Po 24 h od infekce inhibovaly jak sloučenina cidofovir, tak sloučenina **105** produkci infekčního viru a redukovaly virový výtěžek o 2 a 5 log stupňů. Žádné infekční viry nebyly detekovány, když byly oba inhibitory použity v kombinaci. 48 h po infekci byla relativní účinnost antivirotik obrácená: Sloučenina **105** a cidofovir redukovaly virový výtěžek o 1 a 2 log stupně, zatímco kombinace obou sloučenin způsobila redukci o 5 log stupňů. V tomto a dalších pozdějších časech byl účinek obou léčiv mnohem silnější než aditivní efekt, a tak lze jejich působení v kombinaci považovat za synergické. Nicméně, z výsledků bylo zřejmé, že účinek sloučeniny **105** byl po 96 h po infekci poněkud utlumený; sloučenina **105** nevykazovala žádný celkový vliv na virovou replikaci, zatímco cidofovir inhiboval výtěžek 3 log stupňů. Kombinovaný účinek obou léčiv v tomto časovém bodě vykazoval silný kumulativní vliv 4 log stupňů. Zjevná nesourodost mezi testy redukce plaků (Tab. 10) a redukce tvorby (obr. 12a) byla vyřešena, když byly titry buněk asociovaných a extracelulárních virů odděleny a analyzovány nezávisle. Účinek sloučeniny **105** a cidofoviru na výtěžek extracelulárního viru (obr. 12b) byly mnohem konzistentnější v testu redukce plaků. Adenoviry jsou uvolňovány spontánní lyzí a test redukce plaků spočívá v mnohonásobných kolech virové replikace za účelem vytvoření viditelných plaků. Ošetření infikovaných buněk sloučeninou **105** značně zpomalovalo výskyt extracelulárních virů, které v závislosti na tom způsobilo zpoždění každého kola replikace a tak i výskyt plaků. Vliv přidání cidofoviru a sloučeniny **105** v kombinaci na výnos extracelulárního viru byl dramatický (obr. 13). Kombinace velmi časného účinku sloučeniny **105** se zpožděným, ale solidním a dlouhotrvajícím účinkem cidofoviru značně zvýšil jejich kapacitu inhibovat replikaci HAd4. Žádný infekční virus se nepodařilo prokázat v kultivačním médiu až do 72 h po infekci a 96 h po infekci byl ještě výnos virů nižší než vstupní přísun viru (0 h), téměř 5 log stupňů pokles oproti žádnému ošetření léčivy.

Příklad 9

Suché tobolky

- 5 5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin vzorce I z tab. 1 nebo 2, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

	Aktivní složka	1250 g
10	Talek	180 g
	Pšeničný škrob	120 g
	Magnézium stearát	80 g
	Laktóza	20 g

- 15 Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 10

Měkké tobolky

- 20 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek o vzorci I, tab. 1 až 6, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

25 Složení

	Aktivní složka	250 g
	Lauroglykol	2 litry

- 30 Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 11

35 Měkké tobolky

- 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek o vzorci I, tab. 1 a 2, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

40

Složení

	Aktivní složka	250 g
	PEG 400	1 litr
	Tween 80	1 litr

45

- 50 Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween® 80 (polyoxyetylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

PATENTOVÉ NÁROKY

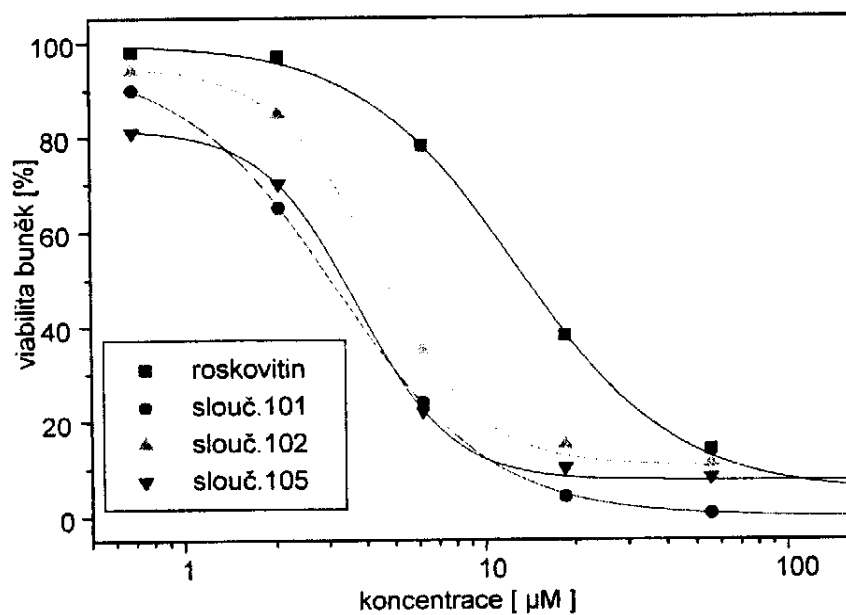
- 5 1. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty vybrané ze skupiny zahrnující
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 10 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)-2-methylpropan-2-ol,
 3-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)pentan-2-ol,
 N⁶-(2-amino-5-chlorbenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 2-({6-[(2-amino-5-fluorbenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 1-({6-[(2-amino-3-methoxybenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)propan-2-ol,
 15 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-methoxybenzyl)amino]-9-isopropyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-ethyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-propyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 20 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-benzyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 2-({6-[(2-amino-5-chlorbenzyl)amino]-9-benzyl-9H-purin-2-yl}amino)butan-1-ol,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 25 N⁶-(2-amino-5-chlorbenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-5-fluorbenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-3-methoxybenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-methyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-ethyl-9H-purin-2,6-diamin,
 30 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-propyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-amino-3-methylbenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2,5-diaminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-cyklohexyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-aminocyklohexyl)-9-benzyl-9H-purin-2,6-diamin,
 35 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(2-aminocyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N⁶-(2-aminobenzyl)-N²-(4-hydroxycyklohexyl)-9-isopropyl-9H-purin-2,6-diamin,
 1-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9H-purin-2-yl}amino)-2-methylpropan-2-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-methyl-9H-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 2-({6-[(2-aminobenzyl)amino]-9-ethyl-9H-purin-2-yl}amino)-3-methylbutan-1-ol,
 40 2-({6-[(2-amino-3-methoxybenzyl)amino]-9-cyklohexyl-9H-purin-2-yl}amino)-butan-1-ol.
2. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití jako léčiva.
- 45 3. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití jako inhibitory CDK.

4. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití při léčbě onemocnění zahrnujících buněčnou proliferaci.
5. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití při léčbě virových infekcí.
6. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 5, kde je virová infekce vyvolána živočišnými a lidskými DNA viry, zejména lidskými cytomegaloviry (HCMV), herpes simplex viry typu 1 a 2 (HSV-1 a HSV-2), varicella zoster viry (VZV), viry Epstein-Barrové (EBV), lidskými herpesviry typu 6, typu 7, typu 8, bovinními herpesviry typu 1, koňskými herpesviry typu 1, papillomaviry (HPV typy 1-55, včetně karcinogenních HPV), adenoviry všech typů, poxviry, polyomaviry nebo papovaviry.
7. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití pro eliminaci nebo redukci virového šíření nebo růstu v systémech tkáňových kultur při produkci biofarmaceutických nebo jiných produktů, pro eliminaci nebo redukci virového šíření nebo růstu v klinických vzorcích, anebo k zastavení růstu tkáňových buněčných kultur při zachování schopnosti buněk produkovat proteiny a sekundární metabolity.
8. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití při léčbě onemocnění, jejichž podstata je založena na buněčné proliferaci, a která zahrnují nádory, restenózu, psoriázu, revmatickou artritidu, diabetes I. typu, roztroušenou sklerózu, Alzheimerovu chorobu, parazitozy způsobené živočichy, houbami anebo prvoky, restenózu, polycystické onemocnění ledvin, odmítnutí transplantátu, dnu a proliferativní onemocnění kůže.
9. Substituované 6-(2-aminobenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 pro použití k indukci apoptózy v savčích buňkách.
10. Farmaceutický přípravek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jeden substituovaný 6-(2-aminobenzylamino)purinový derivát podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelné nosiče.
11. Farmaceutický přípravek podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje jednu nebo více farmaceutických pomocných látek.
12. Farmaceutický přípravek podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje cytostatikum vybrané ze skupiny zahrnující mitoxantron, cis-platinu, methotrexát, taxol a doxorubicin.
13. Farmaceutický přípravek podle nároku 10, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje virostatikum vybrané ze skupiny zahrnující acyklovir, cidofovir, tamiflu a ribavirin.

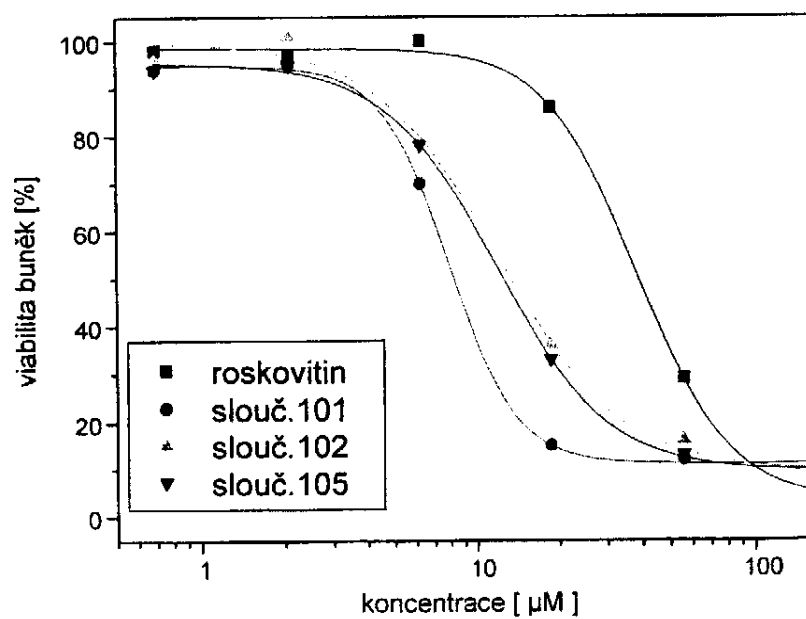
10 výkresů

Obr. 1

Cytotoxicita nových sloučenin vůči MCF7 buňkám

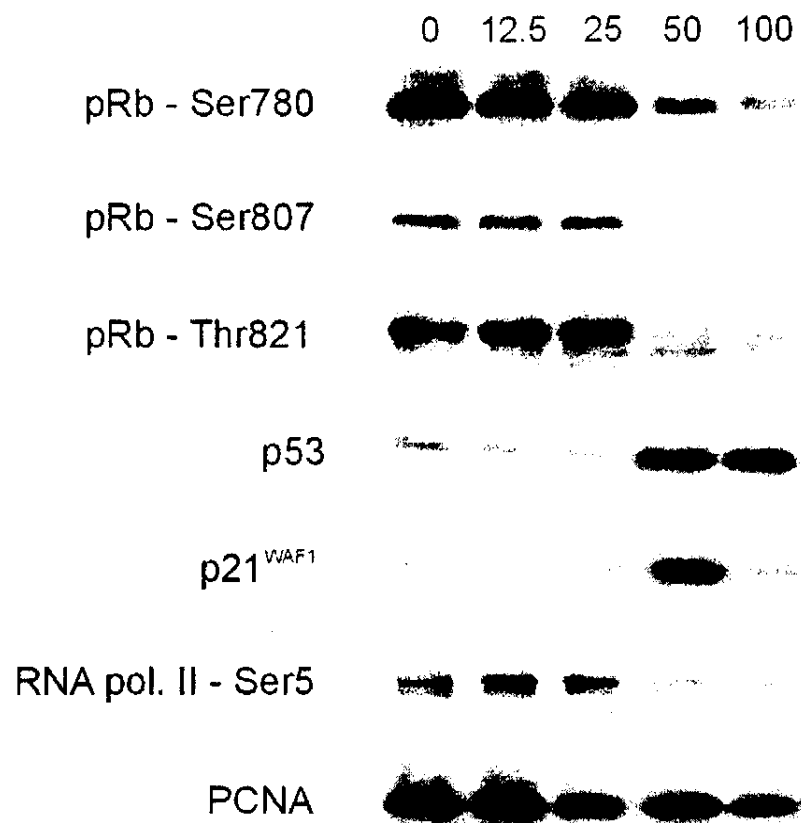


Cytotoxicita nových sloučenin vůči K562 buňkám



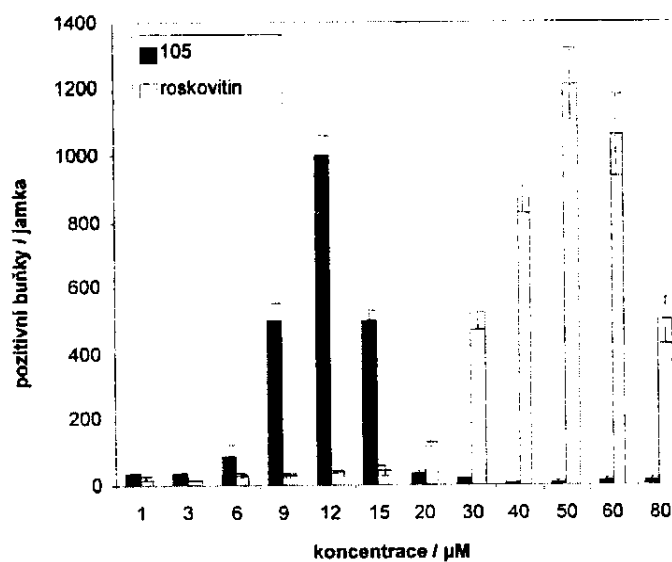
Obr. 2

105

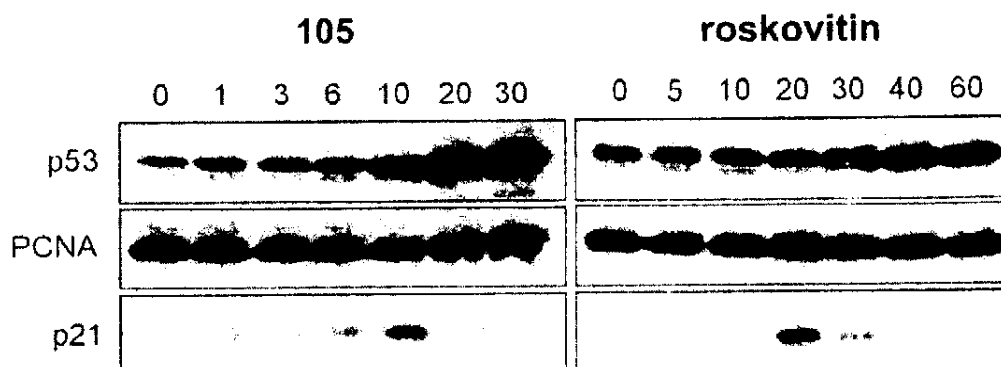


Obr. 3

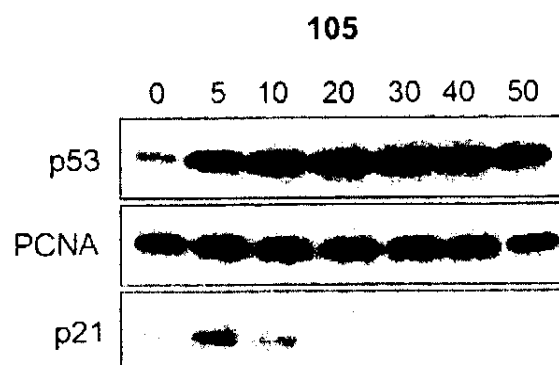
A



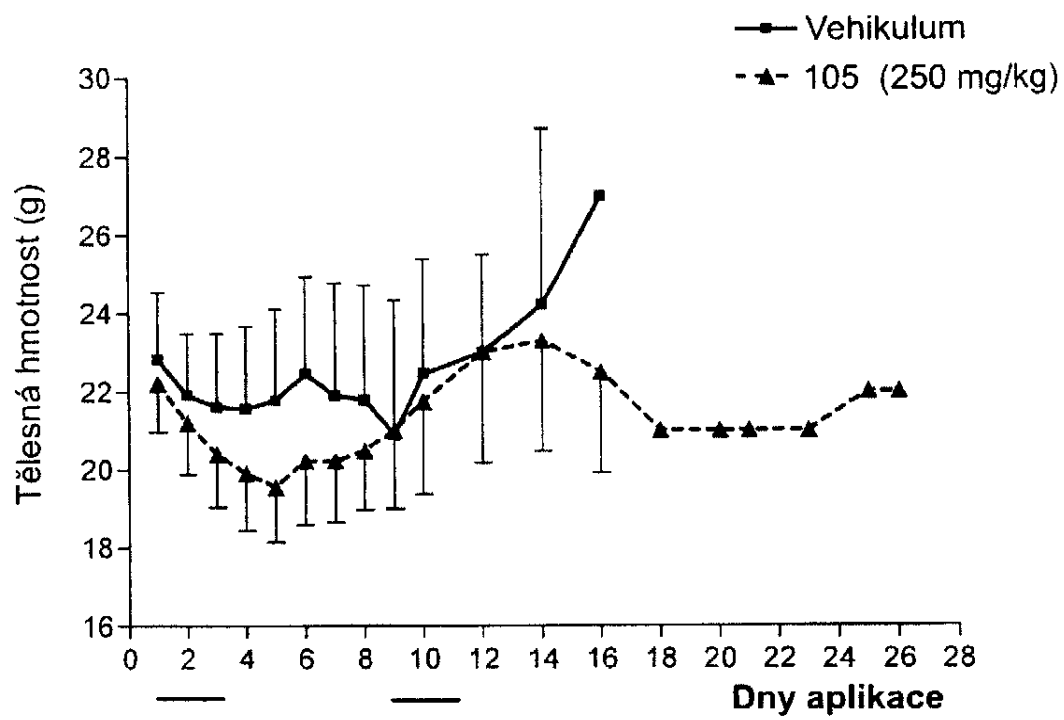
B



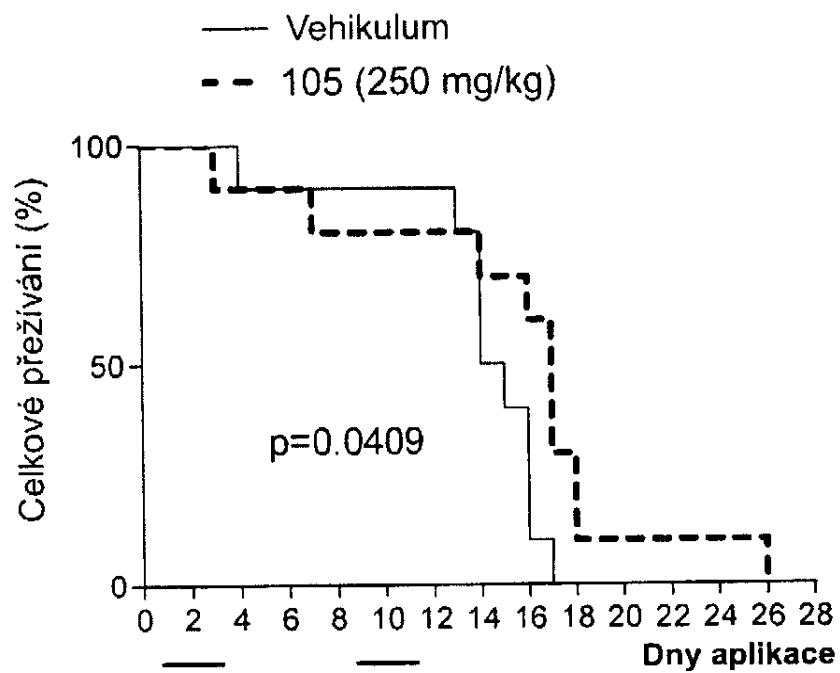
C



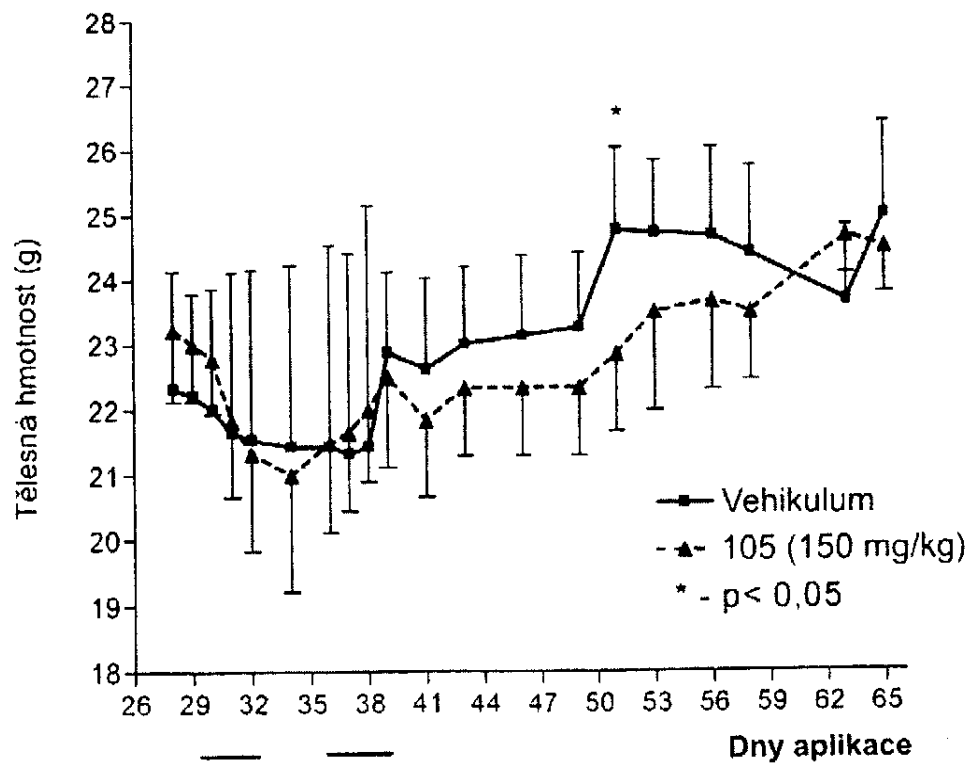
Obr. 4



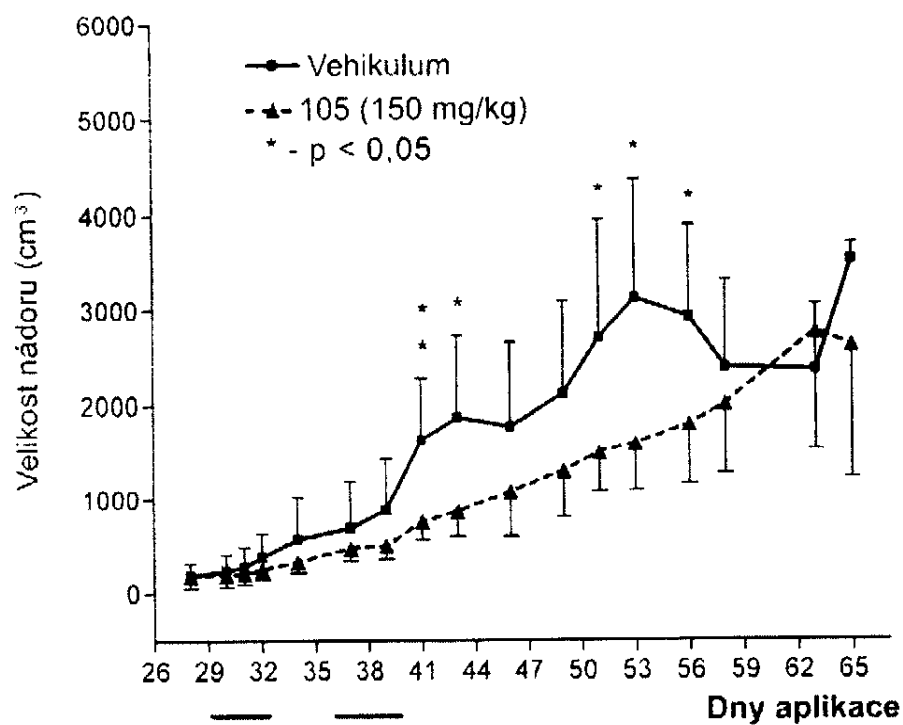
Obr. 5



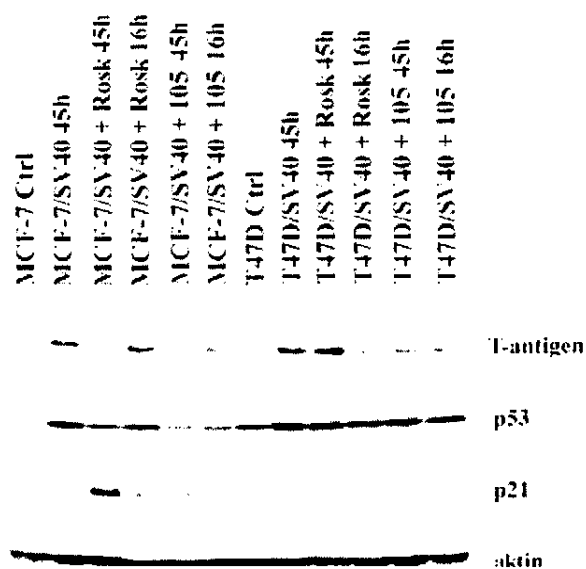
Obr. 6



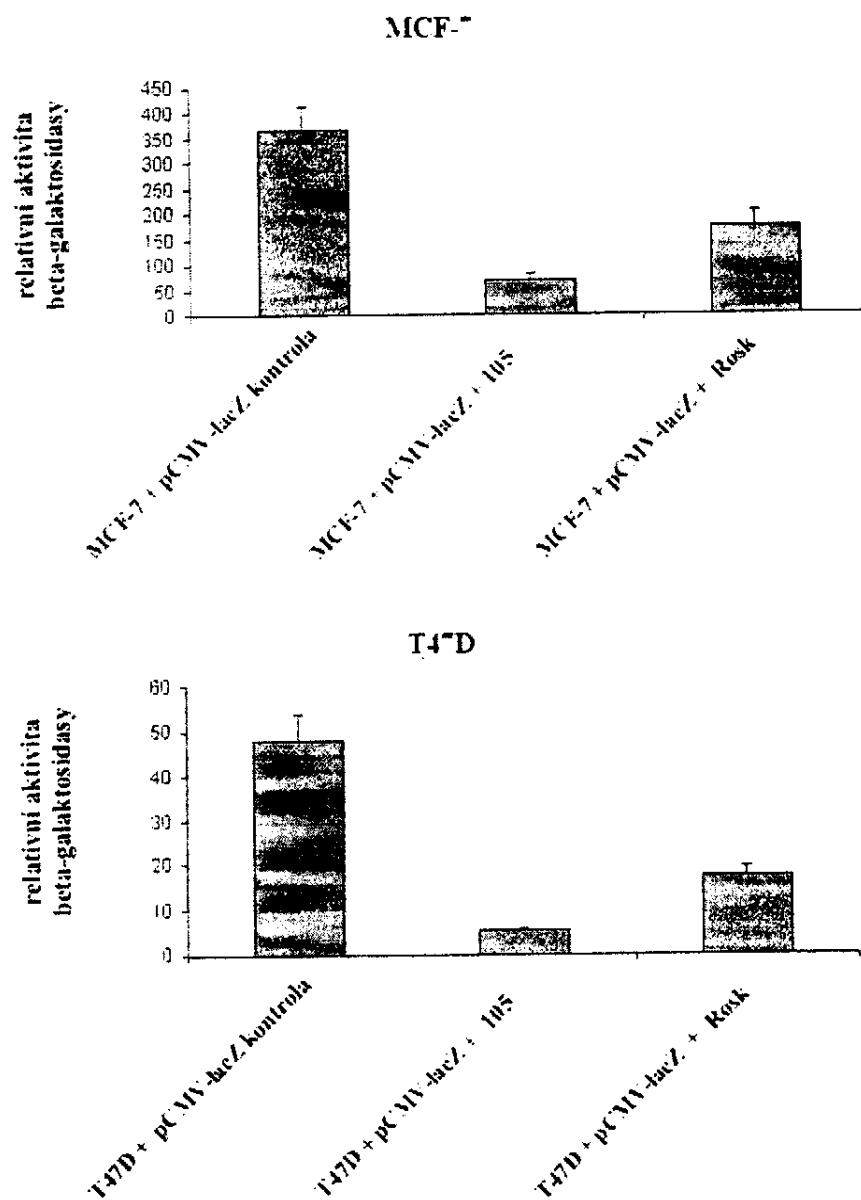
Obr. 7



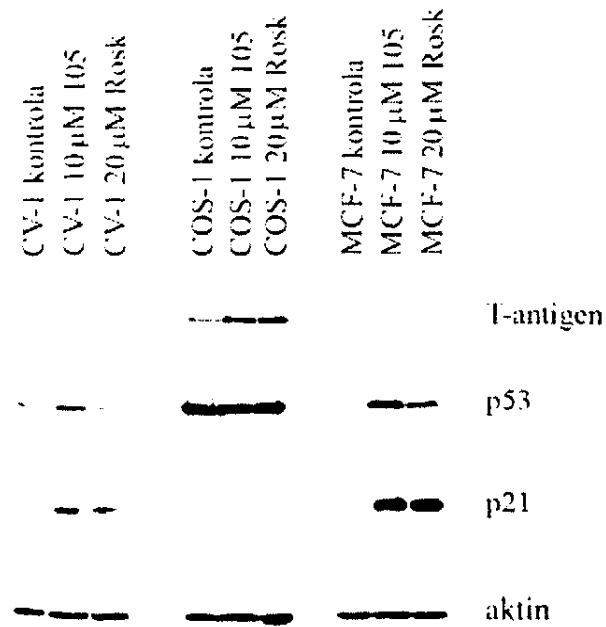
Obr. 8



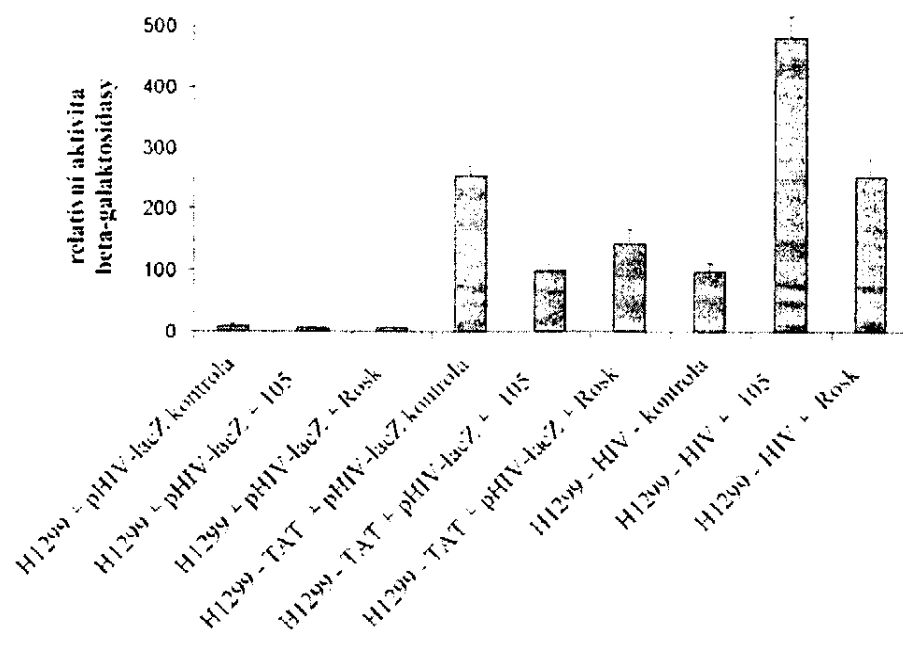
Obr. 9



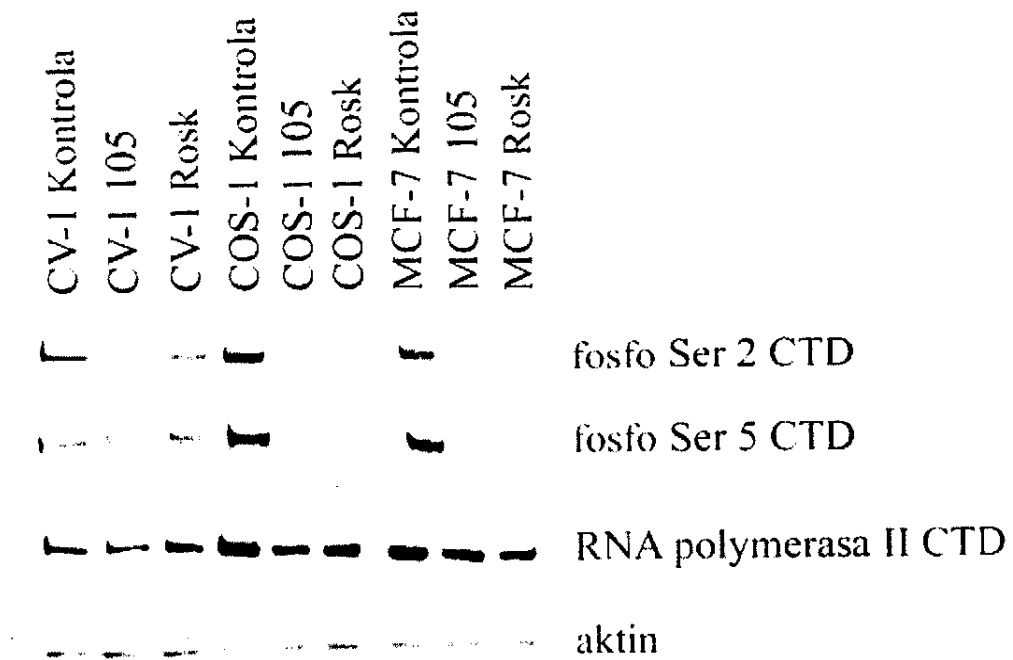
Obr. 10



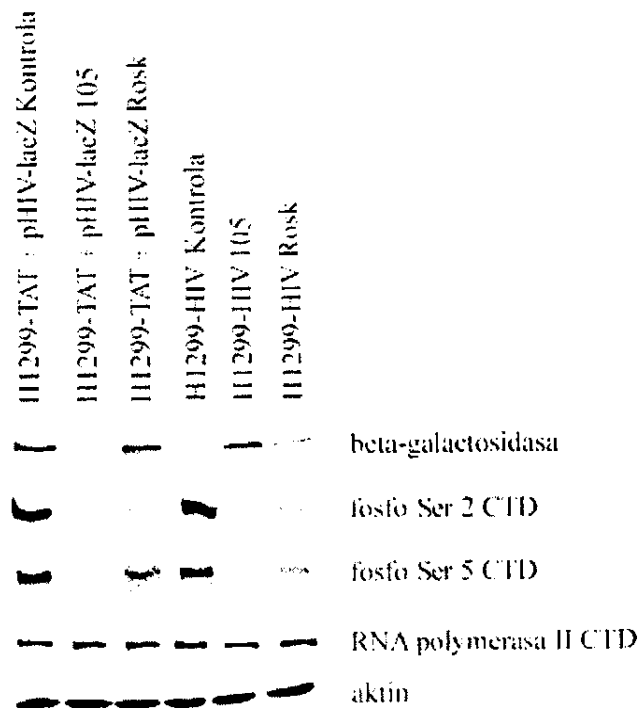
Obr. 11



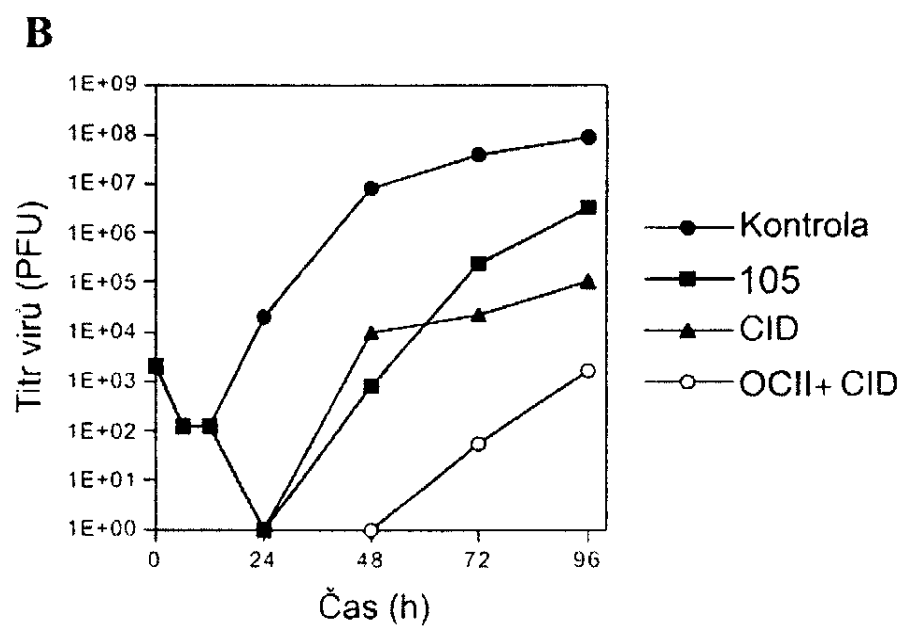
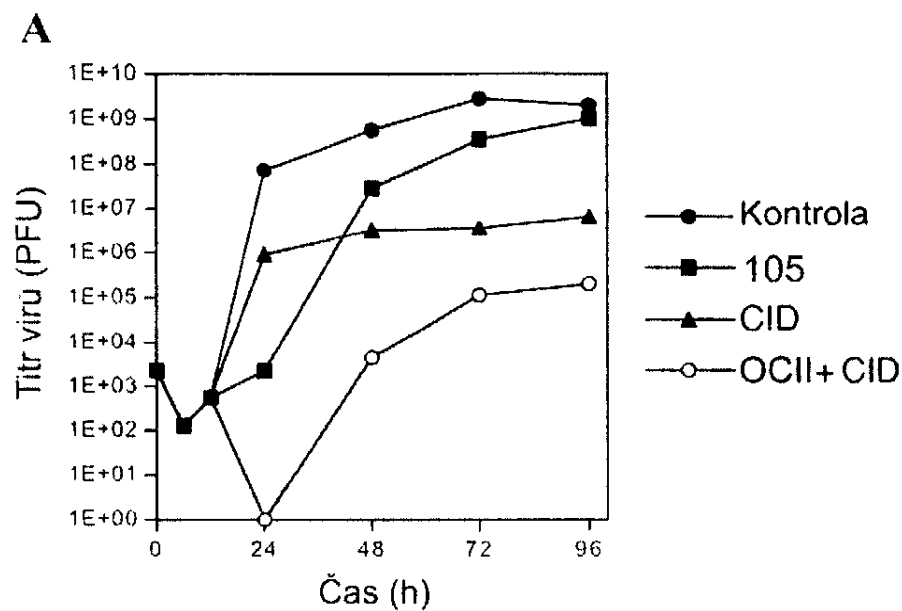
Obr. 12A



Obr. 12B



Obr. 13



Konec dokumentu