

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**SYNTÉZA A BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ PURINOVÝCH  
INHIBITORŮ FOSFATIDYLINOSITOL-3-KINAS A  
PŘÍBUZNÝCH PROTEINKINAS II**

Školitel: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Andrš

Hradec Králové 2017

Kateřina Vejrychová

***Prohlášení:***

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

Diplomová práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt SVV 260 401.

*V Hradci Králové, dne 27. 4. 2017*

.....

Kateřina Vejrychová

***Poděkování:***

*Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. a Mgr. Martinovi Andršovi za jejich cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce, dále doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter, Mgr. et Mgr. Rafaelovi Doležalovi, Ph.D. za měření HRMS a celému kolektivu Prof. MUDr. Martyňky Řezáčové, Ph.D. za biologické testování připravených látek.*

# OBSAH

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1.1 Rakovina .....	11
1.1.1 Definice.....	11
1.1.2 Prevalence.....	11
1.1.3 Rizikové faktory .....	12
1.1.4 Klinický obraz onemocnění .....	13
1.1.5 Patofyziologie .....	14
1.1.6 Metabolismus nádorových buněk .....	15
1.2 Léčba rakoviny.....	18
1.2.1 Konvenční chemoterapie .....	19
1.2.2 Cílená terapie .....	20
1.3 Využití oprav DNA v léčbě rakoviny.....	21
1.3.1 DNA damage response (odpověď na poškození DNA).....	21
1.3.2 Olaparib .....	23
1.3.3 Fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzné kinasy a jejich role v opravách DNA .....	24
1.4 Inhibitory fosfatidylinositol-3-kinas příbuzných kinas.....	26
1.4.1 DNA-PK inhibitory odvozené od LY294002 .....	27
1.4.2 ATM inhibitory odvozené od LY294002 .....	31
1.4.3 ATR inhibitory odvozené od LY294002 .....	32
2 PRAKTICKÁ ČÁST .....	34
2.1 Cíl práce a design nových inhibitorů .....	34

2.2 Syntetická část .....	35
2.2.1 Obecné technické metody .....	35
2.2.2 Obecný postup syntézy .....	36
2.2.3 Syntéza purinových inhibitorů DNA-PK.....	37
2.3 Biologická část.....	49
2.3.1 Materiály a metody .....	49
2.3.2 Výsledky biologického testování.....	50
3 DISKUZE .....	54
4 ZÁVĚR.....	57
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....	58
PŘÍLOHY .....	65

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Kateřina Vejrychová

Školitel: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Andrš

Název DP: **Syntéza a biologické hodnocení purinových inhibitorů fosfatidylinositol-3-kinas a příbuzných proteinkinasy II**

Rakovina je závažné onemocnění s nejistou prognózou a náročnou léčbou. Možnosti terapie se neustále vyvíjí, ale stále není k dispozici účinná léčba pro všechny typy nádorů, a tak se rakovina stále řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v celém světě. Pacienti často podstupují konvenční cytotoxickou terapii nebo radioterapii, které ale mají řadu nežádoucích účinků a nejsou vždy efektivní. Jednou velmi zkoumanou možností, jak tuto léčbu zefektivnit je vyřazení opravných mechanismů poškození DNA, která jsou podstatou účinku radioterapie a některých chemoterapeutik. Pro tento účel jsou vhodné fosfatidylinositol-3-kinasám příbuzné proteinkinasy, zejména pak DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PK), protože se na opravě DNA značnou mírou podílí. V rámci této diplomové práce bylo připraveno 12 potenciálních inhibitorů DNA-PK, ze kterých bylo 9 látek testovaných samostatně na 9 nádorových a 1 nenádorové buněčné linii. Dvě látky byly cytotoxické. Zbývajících 7 sloučenin bylo podrobena chemosenzibilizačnímu testu v kombinaci s doxorubicinem za použití stejných buněčných linií. Pouze jedna sloučenina, **(33)** vykazovala velmi výraznou chemosenzibilizaci nádorových buněk a bude podrobena dalším testům.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Kateřina Vejrychová

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martin Andrš

Title of diploma thesis: **Synthesis and biological evaluation of purine inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinases and related protein kinases II**

Cancer is a serious disease with an uncertain prognosis and difficult treatment. Nowadays, cancer is one of the most common causes of death worldwide. Options of therapies are evolving every year; nevertheless, we still do not have effective treatment available for all types of tumours. Patients often undergo conventional cytotoxic therapy or radiotherapy, which unfortunately have many side effects and they are not always effective. One of the highly researched ways how to make this treatment more effective is to disrupt corrective mechanisms of DNA damage, which are the essence of radiotherapy and some chemotherapeutics. For this purpose, phosphatidylinositol-3-kinase-related proteinkinases, especially DNA-dependent proteinkinase (DNA-PK) seem to be very useful, because they are highly involved in DNA repair. In this diploma thesis, 12 potential inhibitors of DNA-PK were prepared, from which 9 substances were tested alone on 9 tumour and 1 non-tumour cell lines. Two compounds were cytotoxic. The remaining 7 compounds has undergone to a chemosensitization test in combination with doxorubicin using the same cell lines. Only one compound (**33**) showed very significant chemosensitization of the tumour cells and will be subjected to further tests.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMPK	AMP-aktivovaná proteinkinasa
A-T	ataxia-telangiectasia
ATM kinasa	ataxia-telangiectasia mutatedkinasa
ATR kinasa	ataxia-telangiectasia a RAD3-příbuzná kinasa
BRCA1/2	breast cancer 1 a 2
CDK	cyklin-dependentní kinasa
Chk1 a Chk2	checkpointkinasa 1 a 2
CK2	kaseinkinasa 2
DCM	dichlormethan
DDR	DNA damage responce
DMF	dimethylformamid
DNA-PK	DNA-dependentní proteinkinasa
DNA-PK <sub>CS</sub>	DNA-PK katalytická subjednotka
DOX	doxyrubicin
DSB	dvouřetězové zlomy DNA
GP	growth percentage, procento buněk proti kontrole
GSK3	glykogen synthasakinasa 3
HR	homologní rekombinace
hSMG-1	human suppressor of morphogenesis in genitalia-1
MAPK	mitogenem-aktivovaná-proteinkinasa
mTOR	mammalian target of rapamycin
NHEJ	nehomologní spojení konců
NMR	nukleární magnetická rezonance
PARP	poly (ADP ribosa) polymerasa
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIKK	fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzná kinasa
PK	pyruvátkinasa
PTEN	phosphatase and tensin homolog
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTK	receptorová tyrosinkinasa
SD	směrodatná odchylka
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SSB	jednořetězové zlomy DNA
TMEDA	tetramethylethylendiamin



TRRAP	transformation/transcription associated protein
VL	výchozí látka
ZN	zhoubný nádor

## ÚVOD

Rakovina je nejednotné onemocnění projevující se nadměrnou buněčnou proliferací. Existuje v řadě subtypů, z nichž každý má odlišné histopatologické a biologické vlastnosti. Zhoubná onemocnění patří mezi jedna z nejčastějších úmrtí na celém světě.

V rámci lékařského výzkumu je výzkum nových látek v terapii nádorového onemocnění rychle se rozvíjející se obor. Každý rok je připravena řada látek, převážně v rámci cílené terapie, které mohou být využity k terapii rakoviny. Nicméně některé typy tohoto onemocnění se cílenou terapií léčit nedají, a proto je spousta pacientů odkázána na konvenční širokospektrou terapii. Ta s sebou přináší rizika závažných nežádoucích účinků.

Jeden z nových přístupů k terapii spočívá v inhibici systémů, které jsou nezbytné pro opravu poškozené DNA nádorových buněk. Tato oblast je intenzivně zkoumána světovými univerzitami i farmaceutickými firmami a nedávno bylo schváleno první takto působící léčivo, inhibitor poly (ADP ribosa) polymerasy (PARP) – olaparib. Velké naděje se vkládají také do inhibice tří příbuzných kinas: ataxia-telangiectasia mutated (ATM), ataxia-telangiectasia RAD3-příbuzná (ATR), DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PK). Tyto kinasy jsou na vrcholu složitých signalizačních kaskád a od jejich inhibice je očekávaná výrazná senzibilizace buněk na poškození DNA, ale také možnost využít jejich syntetickou letalitu, a cílit na nádorové buňky v monoterapii.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Rakovina

### 1.1.1 Definice

Rakovina je onemocnění charakterizované nekontrolovatelným buněčným dělením. Nádorové buňky se mohou dělit lokálně v místě vzniku a dále mohou napadat či potlačovat okolní tkáň. To může vést k selhání funkcí a následně i ke smrti okolní tkáň. Pomocí krve či lymfatických cest se mohou jednotlivé rakovinné buňky dostat do jiných orgánů, kde se později mohou množit jako tzv. sekundární nádory neboli metastáza. Nádorové buňky se nemusí šířit pouze krví či lymfou, ale také pomocí kontinuity tkání nebo kanalikulárních cest, např. zažívacím traktem nebo tracheobronchiálním stromem.

Nádory lze dělit na maligní a benigní. Benigní jsou pomalu rostoucí novotvary bez invaze do okolní tkáň, bez produkce metastáz, a po jejich odstranění jen výjimečně vznikají recidivy. Naproti tomu maligní nádory jsou charakteristické rychlým dělením, invazí do sousedních tkání, metastázemi a častou recidivou.

Nádorové tkáň mohou být dobře diferencované, strukturou podobné homologní tkáni, nebo naopak mohou být tvořeny nediferencovanými embryonálními buňkami. Solidní nádory jsou vytvořeny zmnožením zhoubných buněk, které tak vytváří kus solidní (pevné) hmoty. Při leukémii dochází naopak k poškození funkce kostní dřeně a následně k deficitu červených i bílých krvinek i krevních destiček.[1]

### 1.1.2 Prevalence

Rakovina patří mezi nejzávažnější choroby celého moderního světa. Ve vyspělých zemích je toto onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Jeho incidence rok od roku stoupá, což je způsobeno zejména růstem a stárnutím populace, ale také úspěšnou diagnostikou raných stádií onemocnění.[2, 3]

Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny bylo v roce 2012 na celém světě více než 70,5 miliónů pacientů trpících zhoubným onemocněním.[4] Nejčastějším typem rakoviny jsou kolorektální karcinom, karcinom prsu, plic a prostaty. Prevalence jednotlivých onemocnění se liší v závislosti na geografické poloze.[4, 5]

V České republice je úmrtí způsobené zhoubným nádorem (ZN) druhé nejčastější, hned po onemocnění oběhového systému. V současné době je v ČR evidováno bezmála půl miliónu onkologických pacientů a každý rok je přibližně 77 000 pacientům zhoubné onemocnění nově diagnostikováno, což je téměř dvojnásobek oproti roku 1990. Nejčastějším typem rakoviny u nás je kolorektální karcinom. V porovnání se zbytkem Evropy je Česká republika na 1. místě v incidenci tohoto nádorového onemocnění.[6, 7]

### 1.1.3 Rizikové faktory

Rakovina je považována za multifaktoriální onemocnění, kde hrají roli jak genetické, tak vnější vlivy. Některé faktory se přenášejí geneticky mezi příbuznými, ale většině rizikových faktorů lze předcházet správným životním stylem. Nicméně vznik rakoviny je často velmi nepředvídatelným procesem, který ani správný životní styl nemusí ovlivnit.[8]

Mezi nejvýznamnější vnější vlivy patří kouření, alkohol a nevyvážená strava spolu s obezitou a minimální tělesnou aktivitou.[8-13] Cigaretový dým obsahuje bezmála 7000 sloučenin, z nichž minimálně 60 je považováno za karcinogenní látky. Jedná se především o aromatické uhlovodíky, které jsou oxidovány enzymy cytochromu P450. Následné metabolity aromatických uhlovodíků pak mají mutagenní účinky na DNA. Navíc dochází k indukci enzymů, především cytochromů CYP1A1/2, CYP2D6 a CYP3A4. Tím dochází ke zvýšenému metabolismu, rychlejšímu odbourávání a snižování účinku látek využívajících se při systémové terapii karcinomu plic.[14]

Nadměrná konzumace alkoholu může přispět k rozvoji rakoviny v oblasti úst, jícnu, žaludku, jater a tlustého střeva. Ethanol má přímý vliv na buňky, kde dochází ke vzniku acetaldehydu. Jedná se v první řadě o buňky jaterní a buňky tlustého střeva.

Alkohol podporuje produkci vysoce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které mohou poškodit DNA. Dále usnadňuje absorpci karcinogenů uvolňovaných při kouření.[15]

Nevhodné složení stravy s převahou tučného a přepáleného masa spolu s nedostatkem ovoce a zeleniny mohou při dlouhodobém užívání vést až ke kolorektálnímu karcinomu. Riziko je spojené s uvolňováním značného množství dusíkatých sloučenin a aromatických polycyklických uhlovodíků, které mají vysokou mutagenní aktivitu.[9] Takové nevhodné složení potravy stojí za vysokým výskytem kolorektálního karcinomu u nás.[6, 7]

U rakoviny prsu nové studie ukazují možný vliv obezity a vysokých hladin LDL a VLDL cholesterolu v krvi na větší riziko rozvoje ZN prsu, především u premenopauzálních žen.[12, 16, 17]

Mezi neovlivnitelné faktory patří především genetická zátěž, která výrazně zvyšuje riziko vzniku rakoviny, ale i postmenopauzální věk žen u rakoviny prsu.[18-21] Jedním z důležitých a těžko ovlivnitelných faktorů je i složení životního prostředí. Jedná se především o mutagenní látky typu furanonů, nitrofuránů, fungicidní látky, halogenované benzaldehydy, kadmium či polycyklické aromatické uhlovodíky. Tyto látky se uvolňují do ovzduší při vulkanické erupci, ale hlavními zdroji jsou spalování fosilních paliv a ropných produktů v průběhu průmyslové výroby a při pěstování a zpracování potravin.[22, 23]

#### 1.1.4 Klinický obraz onemocnění

Rakovina, jak již bylo řečeno, je onemocnění širokospektré, postihující různé orgány a projevující se různými symptomy. Mezi znaky, které mohou na rakovinu poukazovat, patří například nepřírozená a silná bolest, únava, hmatatelná boule, ztráta hmotnosti, zvýšená teplota, nechutenství a zažívací problémy. Může se objevit i krvácení, především při onemocnění trávicího traktu, ledvin, močového měchýře a plic. Karcinom plic je charakteristický silným kašlem, který neustupuje a omezuje pacienta v dýchání.[24]

Včasné příznaky rakoviny jsou dost nespecifické a často jsou pacienti přehlíženy. Proto jsou ZN v mnoha případech diagnostikovány až v pokročilých stádiích. Obecně platí, že čím včasnější diagnóza, tím lepší prognóza. Proto se nyní klade velký důraz na poskytování preventivních vyšetření, které mohou rozvíjející se onemocnění zachytit už v raných stádiích. Jedná se především o screening rakoviny děložního hrdla, prsu, a kolorektálního karcinomu.[25, 26]

### 1.1.5 Patofyziologie

Vzniku rakovinného bujení zpravidla vždy předchází mutace v DNA. Mutace DNA mohou vznikat při replikaci či transkripci, oxidačním stresem, nebo mohou být způsobeny vnějšími faktory jako UV zářením či dalšími mutagenními látkami. Poškození DNA bývá celkem běžné, proto mají buňky velmi propracovaný systém oprav DNA. Nicméně občas může nějaká mutace uniknout kontrole. Vzniklá mutace se pak nemusí vůbec projevit, může vést ke smrti buňky, anebo se může dále šířit.[27]

Změny v určitých kritických genech pak mohou vést přímo k iniciaci rakovinného bujení. Jedním typem těchto genů jsou protoonkogeny. Jsou to geny, které kódují různé regulační proteiny nebo receptory, a při jejich mutaci na onkogen může dojít k poruše signalizace uvnitř buňky, která se tak začne nekontrolovatelně dělit.[28]

Jako modelové signální dráhy lze zmínit Ras/PI3K, mTOR a Ras/MAPK. Růstové faktory aktivují přes receptorovou tyrosinkinasu (RTK) Ras protein, který přenáší impulsy efektorovými dráhami, hlavně fosfatidylinositol-3-kinasami (PI3K/Akt) a mitogen-aktivovanou-protein-kinasou (MAPK).[29, 30] PI3K dráhy vedou ke glykolýze díky zvýšené expresi a membránové lokalizaci membránového transportéru pro glukosu GLUT1, stimulují fosfofruktokinasu [31] a aktivují mammalian target of rapamycin (mTOR), jenž se podílí na biosyntéze lipidů a celkově ovlivňuje metabolismus buňky.[32] Jako příklad mutace v této dráze lze uvést gen *PK3CA*, kódující podjednotku PI3K $\alpha$ . Tato mutace, častá při rakovině tlustého střeva, jater i prsu, produkuje vadnou PI3K $\alpha$  kinasu, která je vysoce reaktivní a signalizuje buňce, že má dále růst a dělit se. Velmi často bývá zmutován i Ras protein, který je pak stále aktivní i v nepřítomnosti růstového faktoru.[33]

Další geny s přímou spojitostí s rakovinou jsou tumor supresorové geny. Tyto geny většinou kódují proteiny s represivní funkcí, které brzdí a regulují růst buněk. Při jejich mutaci opět dochází k poruše signalizace uvnitř buněk, které se dále mohou dělit.[34]

Jedna z nejčastějších mutací rakovinných buněk je mutace tumor supresorového genu p53, tzv. strážce genomu. U buněk s touto mutací dochází k poruchám oprav DNA, což se projevuje dalšími mutacemi a akcelerací vzniku a šíření rakoviny. Mimo to, dochází i ke zvýšenému metabolismu glukosy a zvýšenému množství uvolňovaného laktátu.[35]

Každá signální dráha má jednak aktivátory, tak i represory. Již výše zmíněná signální dráha Ras/PI3K/mTOR je regulována pomocí proteinu PTEN (phosphatase and tensin homolog), který přímo potlačuje signály PI3K. Podílí se tak na regulaci buněčného cyklu, na kontrole buněčného dělení a v případě potřeby se zúčastňuje i navození apoptózy buňky.[36]

Rakovinové bujení je otevřený, komplexní a adaptivní systém, kde se jednotlivé složky nádorových buněk mohou měnit v čase a prostoru a přizpůsobovat se podmínkám prostředí. Přejít ze zdravé buňky na buňku nádorovou je proces vícestupňový a zahrnuje mnoho procesů a signálních drah.[37]

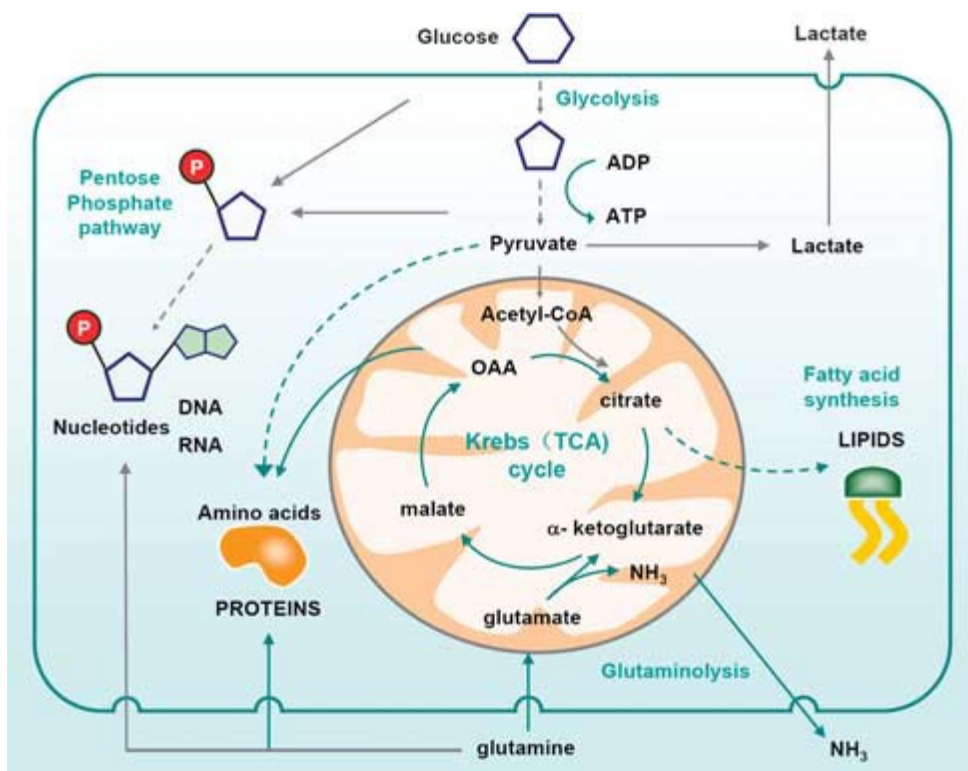
#### 1.1.6 Metabolismus nádorových buněk

Rychle se množící buňky potřebují hojný a nepřetržitý přísun živin.[38] Jejich metabolismus tak spočívá v glykolýze, kdy dochází ke vzniku menšího množství ATP než při oxidativní fosforylaci. Jedná se o tzv. glykolytický fenotyp, kdy se nádor díky mitochondriální mutaci adaptuje na hypoxické prostředí a není schopen buněčného dýchání.[39]

U rostoucího nádoru dochází ke vzniku stále těžších hypoxických podmínek[40], proto dochází ke změnám v metabolismu glukosy za vzniku laktátu. Takové hypoxické a kyselé prostředí následně způsobuje chromozomální nestabilitu, která může způsobovat vznik dalších geneticky poškozených buněk.[41]

Pro růst buněk je potřebný zvýšený přísun glukosy a glutaminu. Glukosa se metabolizuje glykolýzou na pyruvát, který vstupuje do Krebsova cyklu, nebo se vylučuje v podobě laktátu. Tato přeměna z pyruvátu na laktát je zapotřebí k regeneraci  $\text{NAD}^+$ , který je nutný pro proces glykolýzy. Glukosa spolu s aminokyselinami jsou důležité pro výrobu nukleových kyselin prostředím pentosofosfátové cesty. Zvýšená glykolýza spolu s biosyntézou lipidů jsou typické pro rychle se dělící buňky.[42]

Uvolnění laktátu přispívá k metabolické acidóze, která se u pevných nádorů běžně vyskytuje. Kyselé prostředí brání normální funkci imunitních buněk a může vést ztrátě aktivity T-lymfocytů. Takto lokálně potlačená imunita slouží jako základ pro malignitu a její další progresi. Metabolický rozvrat způsobený acidózou je také jednou z příčin mortality rakoviny.[43]

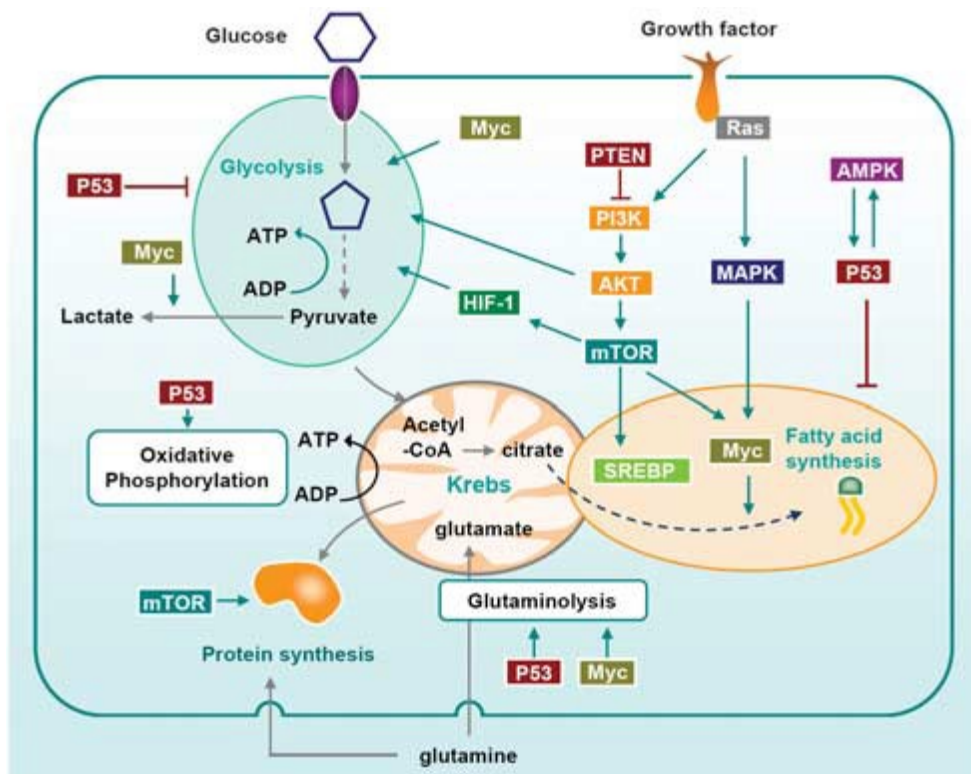


**Obrázek 1.** Metabolismus dělících se buněk.[39] Dělící buňky vyžadují přísun glukosy, která se prostřednictvím glykolýzy mění na pyruvát, ze kterého následně vzniká acetyl-CoA. Ten vstupuje do Krebsova cyklu ve formě citrátu nebo se vrací zpět do cytosolu, kde je využit pro syntézu lipidů. Glukosa může být mimo jiné využita jako zdroj uhlíku pro přípravu ribosy-5-fosfátupentosofosfátovou cestou, ze které se produkuje RNA a DNA. Glykolytické produkty se spolu s glutaminem mohou využívat pro výrobu dalších



aminokyselin a bílkovin. Odpadní látky se vylučují z buňky ve formě laktátu (vznikající většinou z glykolýzy) a amoniaku, látky vznikající z metabolismu aminokyselin.

Vysoká míra proliferujících nádorových buněk nutí produkovat více energie a další makromolekuly. Klíčovou roli hrají pyruvátkinasy (PK), jakožto poslední enzymy glykolytické dráhy, kdy se z fosfoenolpyruvátu stává pyruvát za uvolnění ATP. Ze 4 forem PK (L, R, M1 a M2)[44] je PKM2 převládající formou PK v rakovinných buňkách a její aktivitu lze upravovat buněčným potřebám.[45] Její nízká aktivita podporuje vznik glykolytických produktů pro další biosyntetické cesty.[46]



**Obrázek 2.** Signalizační dráhy regulující metabolismus a proliferaci nádorových buněk.[39] Růstové faktory ovlivňují metabolismus přes Ras a PI3K. PI3K a MAPK následně zvyšují glykolýzu a indukují upregulaci transkripčního faktoru SREBP (sterol regulatory element-binding protein), který podporuje lipogenezi. mTOR hraje hlavní roli metabolického spínače, aktivuje translaci proteinu, glykolýzu a lipogenezi. Myc je hlavní onkogen podílející se na upregulaci syntézy glutamátu, také zvyšuje glykolýzu a produkci laktátu. AMPK je kontrolní protein, reagující na ATP, jehož funkce je často v nádorových buňkách narušena, čímž umožňuje buňkám přepínání mezi metabolismem a katabolismem podle toho, jak je množství živin vzácné. p53 reguluje látkovou

výměnu prostřednictvím up-regulace syntézy glutamátu a inhibicí syntézy mastných kyselin a glykolýzy.

## 1.2 Léčba rakoviny

V současné době se využívá několik léčebných procesů k léčbě rakoviny. Patří sem chirurgická léčba, což je základní a nejstarší metoda zahrnující odstranění nádoru v místě patologického vzniku. Tato metoda je ovšem limitována velikostí a umístěním nádoru, např. při nádorech v lymfatických uzlinách nebo spinálních nádorech, ale také při tvorbě metastáz. Často se kombinuje s radioterapií nebo chemoterapií, které umožňují zmenšení ZN před operací, nebo zabránění recidiv po operaci.

Radioterapie je založena na skutečnosti, že ionizující záření ničí nádorové buňky díky zlomům v DNA. Moderní přístroje dokážou velmi přesně zacílit záření na nádorovou tkáň, nicméně je radioterapie stále velkou zátěží pro okolní tkáně i celý organismus. Některé buňky bývají díky opravným mechanismům DNA resistantní, i tak ale patří radioterapie mezi nejúčinnější a nejčastější typy léčby ZN.

Farmakologická (systémová) léčba se dá rozdělit na konvenční chemoterapii, cílenou léčbu, hormonální terapii a paliativní léčbu. Chemoterapie je proces, při kterém působí chemické látky na rychle se dělící buňky. Výhodou je, že působí na primární nádor i metastázy, ale velkou nevýhodou je, že působí cytotoxicky i na buňky zdravé, především v oblasti gastrointestinálního traktu či kostní dřeni.[1]

Cílená léčba využívá širokou škálu přímých i nepřímých postupů v léčbě rakoviny (viz dále). Přímé postupy cílí na nádorové signální dráhy buď monoklonálními protilátkami, anebo léčivy s malou molekulou. Nepřímé postupy působí na nádorové antigeny, které jsou exprimovány na buněčném povrchu a slouží jako cíl pro ligandy, které mohou obsahovat různé druhy efektorových molekul. Díky těmto přístupům může terapie přesně zacílit na nádorové buňky, které obsahují specifické protilátky nebo peptidové ligandy, a zastavit dělení nádorů.[47]

V současné době se uplatňuje i mnoho minoritních typů léčby ZN. Mimo již zmíněných základních typů léčby můžeme zmínit i hypertermii, fototerapii nebo

imunoterapii. Hypertermie způsobuje léze v nádorových buňkách díky teplotě převyšující 43°C. Taková teplota působí cytotoxicky hlavně na buňky v kyselém prostředí, jak je tomu právě u nádoru. Bývá často pomocnou terapií k chemoterapii a radioterapii. Fototerapie se vztahuje na použití fotosenzitivních látek, které se akumulují v maligních tkáních a při působení určitých vlnových délek způsobují destrukci zhoubných nádorů. Imunoterapie je strategie využívána do kombinací k chirurgické terapii, radioterapii či chemoterapii. Využívá aktivitu T-lymfocytů, které působí na nádorové buňky díky jejich specifickým antigenům na povrchu. Proto se imunologická léčba někdy také řadí do systémové léčby.[1]

### 1.2.1 Konvenční chemoterapie

Konvenční terapie je formou systémové léčby rakoviny. Její účinek spočívá v ovlivnění základních funkcí dělicích se buněk, hlavně DNA replikace a transkripce a cytoskeletu, čímž dochází k zastavení dělení či smrti buněk. Podstatou této léčby je větší senzitivita nestabilních a rychle se dělicích nádorových buněk než buněk zdravých. V současné době se nejvíce využívají 4 skupiny konvenčních cytostatik. Jsou to látky tvořící adukty s DNA, poškozující syntézu DNA a nukleotidů, interagující s topoisomerasami a mitotické jedy.

Cytostatika tvořící adukty s DNA navozují apoptózu buněk, způsobenou kovalentní modifikací nukleofilních míst v DNA. Patří sem skupina látek vycházejících z dusíkatého yperitu (cyklofosfamid, chlorambucil), alkansulfonových kyselin (busulfan), triazeny (temozolomid), deriváty nitrosomočoviny (lomustin), nebo komplexy platiny (cisplatina, karboplatina).

Antimetabolity poškozují syntézu nukleotidů a funkci DNA. Mohou napodobovat přirozeně se vyskytující struktury jako kyselinu listovou (methotrexát), purinové báze (merkaptopurin) či pyrimidinové báze (5-fluorouracil, kapecitabin) nebo mohou blokovat enzym ribonukleotidreduktasu (hydroxyurea), který se podílí na syntéze nukleotidů.

Látky interagující s topoisomerasami způsobují při replikaci zlomy, čímž je u buněk vyvolána apoptóza. Jedná se o kamptoteciny (topotekan, irinotekan), které

interagují s topoisomerasou I, o podofylotoxiny (etoposid), které inhibují topoisomerasu II. Do této skupiny lze zařadit i internační látky–antracykliny (doxorubicin, epirubicin), které se začleňují do dvoušroubovice DNA a tím také inhibují topoisomerasu II.

Tzv. mitotické jedy se vážou na dělicí vřeténka a blokují tak buněčnou M fázi (mitóza), kdy dochází k rovnoměrnému buněčnému dělení. Patří sem alkaloidy rodu Vinca (viblastin, vinkristin, vinorelbin) a Taxany (paklitaxel, docetaxel).[48]

Při terapii konvenčními cytostatiky se používají maximální tolerované dávky v opakujících se intervalech, aby došlo ke zničení co největšího počtu nádorových buněk a zároveň nebyl ohrožen pacient. Často se také podává kombinační léčba více cytostatiky, pro dosažení maximálního působení kombinací více mechanismy účinků. Kombinace léků ve vysokých dávkách s sebou samozřejmě přináší široké spektrum nežádoucích účinků. Ty lze rozdělit na okamžitě se projevující a projevující se opožděně. Rychle se projevující účinky jsou především nechutenství, zvracení, únava, průjem. Tyto projevy postupem času odezní. Příznaky, které se mohou objevit i delší dobu po prodělané terapii, jsou závažnější. Jedná se především o alopecii, orgánovou toxicitu, supresi kostní dřeně, narušení hormonální rovnováhy a kognitivních funkcí, neuropatii či sekundární malignitu.[49]

### 1.2.2 Cílená terapie

Cílená léčba využívá nejnovějších poznatků o vzniku jednotlivých typů ZN a jejich fungování. Léčiva cílené terapie jsou navržena tak, aby interagovala se specifickým cílovým proteinem, který má rozhodující úlohu v růstu nádoru nebo jeho progresi. Tento přístup je tak v rozporu s konvenční terapií, která zasahuje buněčné struktury potřebné k růstu všech buněk. Molekulová identifikace rakovinných antigenů otevírá nové možnosti pro vývoj účinné imunoterapie, terapie využívající protilátky, a především pro ligand-cílenou terapii. Mohou se kombinovat s chemoterapií či radioterapií pro zlepšení selektivity protinádorových léčiv a snížení jejich toxicity.[47]

Cílená léčiva existují ve dvou formách, jako monoklonální protilátky a nízkomolekulární inhibitory kinas. Terapie pomocí monoklonálních protilátek navazuje na úspěchy imunoterapie. S pokročilejšími technologiemi bylo možné připravit

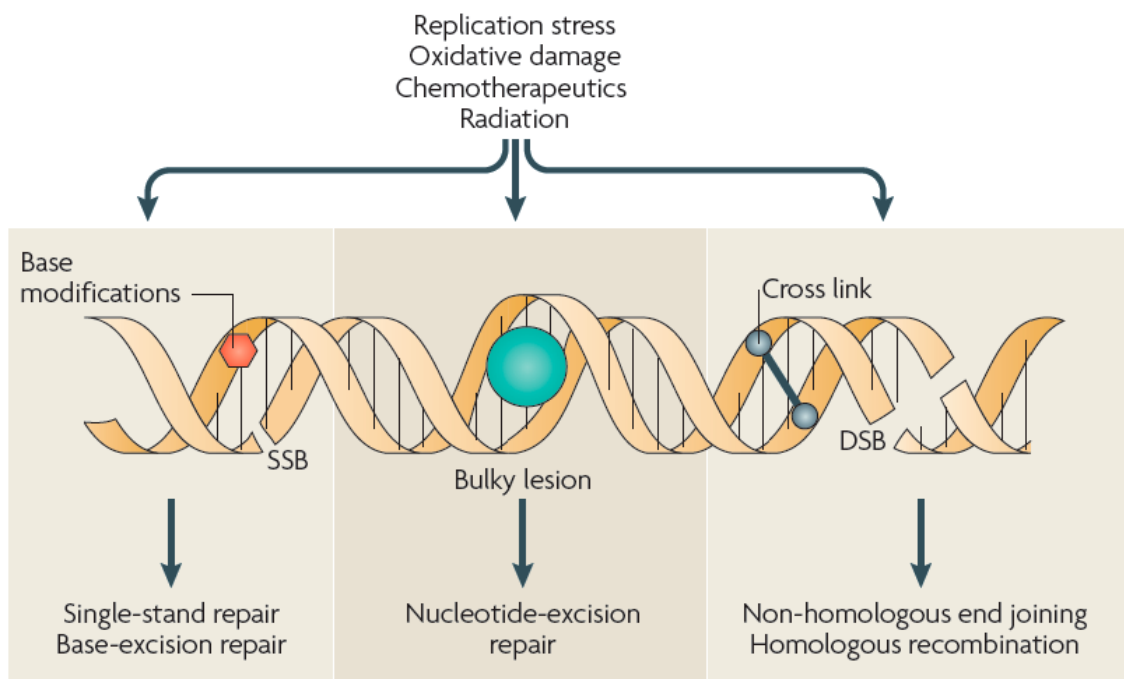
protilátky, které dokážou cílit a vázat se velmi specificky na buněčné struktury nádorových buněk. Jejich mechanismus je různý. Mohou se vázat a blokovat receptorové tyrosinkinasy (RTK), což jsou receptory růstových signálů a u rakovinných buněk jsou často nadměrně aktivní. Tzv. protilátkové konjugáty jsou kombinací imunoglobulinů nebo jejich fragmentů s vhodnou složkou. Může se jednat např. o toxiny, cytostatika či radionuklidy. Díky imunoglobulinové části, která má antigenní specifitu, dojde k nasměrování efektorové složky přímo k nádorovým buňkám.[50]

V současné době se výzkum zaměřuje na použití nízkomolekulárních inhibitorů RTK i preceptorových tyrosinkinas[51], což jsou důležité mediátory signalizačních kaskád, které následně určují klíčové role v různých biologických procesech, jako je růst, diferenciace, metabolismus či apoptóza. Navíc se podílejí na angiogenezi a neovaskularizaci nádorové tkáně. Imatinib je první nízkomolekulární léčivo cílené terapie v léčbě nádorového onemocnění, především v léčbě chronické myeloidní leukémie. Jeho mechanismus účinku spočívá ve specifické inhibici fúzního proteinu BCR-ABL, který je specifický jen pro nádorové buňky, a který fosforylací aktivuje celou řadu proteinů klíčových pro proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk.[52]

## **1.3 Využití oprav DNA v léčbě rakoviny**

### **1.3.1 DNA damage response (odpověď na poškození DNA)**

Poškození DNA představuje pro buňku velkou hrozbu, proto se u nich vyvinuly složité mechanismy k odhalení a opravení DNA lézí, souhrnně nazývané jako DNA damage response (DDR, Obr. 3). Jedná se o složitou signalizační síť, která má za úkol rozpoznat poškození DNA, pozastavit buněčný cyklus a pokud to lze, tak poškození opravit, v opačném případě nasměrovat buňku k apoptóze.



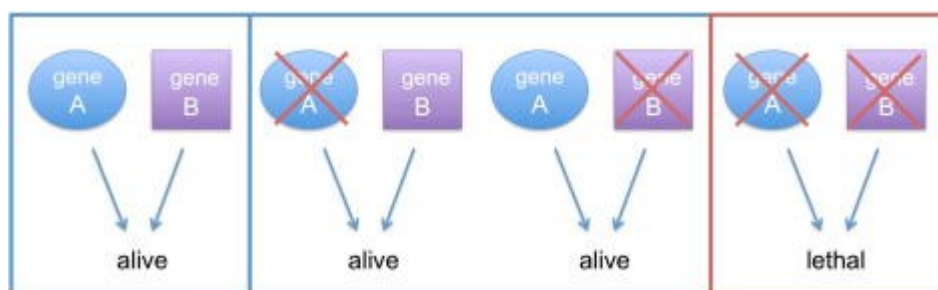
**Obrázek 3.** Druhy DNA poškození a jejich následné signalizační dráhy pro opravu DNA.[53] Různé typy poškození DNA se mohou objevit v buňce v důsledku chybné replikace, vzniku volných radikálů z oxidačního stresu nebo ionizací, UV zářením či působením chemoterapeutik. Tyto děje mohou způsobit jedno nebo dvouřetězové zlomy v DNA, modifikovat báze, způsobovat křížové vazby mezi řetězci DNA či objemnými lézemi narušit spirálovitou strukturu DNA.

Typů DNA lézí je celá řada, stejně tak i mechanismů, které následně DNA opravují. V rámci této diplomové práce se budu věnovat především dvouřetězovým zlomům DNA (DSB, double strand breaks), které jsou těmi nejzávažnějšími typy DNA poškození. DSB jsou způsobovány ionizujícím zářením, některými typy chemoterapeutik, např. inhibitory topoisomeras, reaktivními formami kyslíku (ROS) a mechanickým namáháním chromozomů. Tyto zlomy následně aktivují proteinkinasy ATR, ATM a DNA-PK.[54]

V posledních dvou dekadách jsou DDR velmi studovány pro svou využitelnost v rámci terapie nádorových onemocnění. Většina současné konvenční protinádorové terapie je založena na poškození DNA, což vede k odumření nádorových buněk. Taková terapie je ale často ztížena rezistencí nádorových buněk, protože nádorové buňky mají poškozené signalizační dráhy pro buněčnou smrt a zároveň jsou schopny poškozenou DNA opravit. Proto jsou v rámci současného výzkumu zkoumány inhibice jednotlivých

klíčových složek systému oprav DNA, které by mohly vést k vyšší účinnosti léčby a zároveň ke snížení potřebné dávky cytotoxických agens.[55]

Kromě toho lze inhibici cest zodpovědných za opravu DNA použít i v monoterapii, a to využitím syntetických letálních interakcí.[56] Syntetická letalita je typ genetické interakce, kdy výskyt jedné genetické události neovlivní životaschopnost buňky, ale u dvou událostí či poruch již vede ke smrti buňky či celého organismu (Obr. 4).[57] Vzhledem k tomu, že nádorové buňky obsahují celou řadu různých mutací a poruch, jsou tyto interakce velmi slibné pro vývoj nových léčiv. Léčiva působící tímto principem by tak měla být velmi účinná a naprosto selektivní vůči nádorovým buňkám. Tímto principem působí také olaparib, zatím jediné léčivo tohoto typu.[58]



**Obrázek 4.** Schematické znázornění syntetické letality. V tomto případě delece pouze genu A nebo pouze genu B nemá vliv na životaschopnost buňky, ovšem inaktivace obou genů najednou je smrtelná.[57]

### 1.3.2 Olaparib

Je první léčivá látka využívající DDR a syntetické letality, která byla schválena pro léčbu nádorů prsu a vaječníků s mutací v genu breast cancer 1 a 2 (BRCA1/2). Jedná se o inhibitor poly (ADP ribosa) polymerasy (PARP), což je důležitá součást kaskády opravující jednořetězcové zlomy (SSB) v DNA, které vznikají například poruchami replikace DNA. Olaparib využívá syntetické letality PARP s mutací BRCA1/2 tumor supresorových genů, která dělá tyto nádorové buňky extrémně citlivé na inhibici PARP. Mutace BRCA jsou časté, jak už název napovídá, u rakoviny prsu, ale vyskytují se i u rakoviny vaječníků. Inhibice PARP v BRCA1/2 mutovaných buňkách vyvolává nahromadění SSB a posléze i DSB a nakonec vede až k buněčné smrti. Monoterapie olaparibem je všeobecně velmi dobře snášena, nežádoucí účinky se

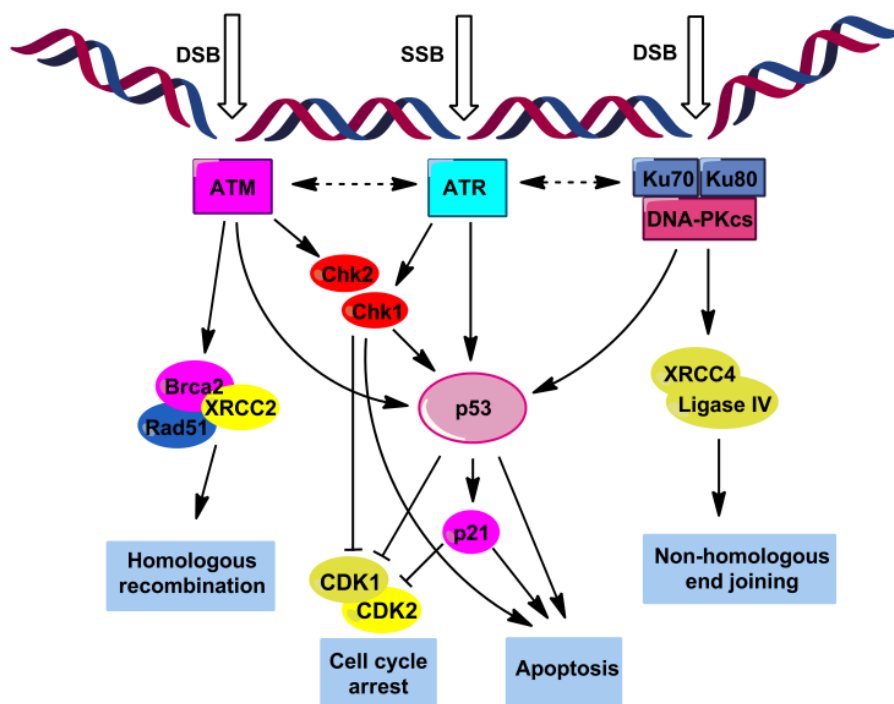
projevují většinou ve formě nauzey, nechutenství, únavy, průjmu a změn v krevním obraze.[58]

### 1.3.3 Fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzné kinasy a jejich role v opravách DNA

V rámci DDR existuje mnoho možných cílů pro inhibici. Mimo již zmíněné PARP inhibitory jsou také ve zkoumání inhibitory cyclin dependentních kinas (CDK) nebo checkpointkinas 1 a 2 (Chk1/2). Velký potenciál se ale očekává od inhibice fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzných kinas (PIKK), které hrají při DNA poškození jednu ze základních rolí. PIKK je skupina šesti atypických serin/treonin proteinkinas strukturně odlišných od klasických proteinkinas. Jejich kinasová doména je podobná právě PI3K, proto se PIKK někdy označují jako atypické proteinkinasy. Patří sem kinasy hrající roli v opravách DNA: ATM, ATR, DNA-PK, human suppressor of morphogenesis in genitalia-1 (hSMG-1), dále mTOR, který hraje roli v metabolismu buňky a transformation/transcription associated protein (TRRAP), který však postrádá kinasovou aktivitu.[59]

Název ATM kinas je odvozen od ataxie-telangiectázie (A-T), což je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu ATM. Onemocnění se vyznačuje extrémní radiosenzitivitou, chromozomální nestabilitou, predispozicí k rakovině, anomáliemi v buněčném cyklu, imunodeficiencí a neuropatologií.[60] Tato kinas je zodpovědná převážně za opravu DSB (Obr. 5). ATR kinas se převážně podílí na opravě SSB vzniklých při replikaci, ale také se může spolu s ATM podílet na opravě DSB.[61] DNA-PK je holoenzym, který obsahuje DNA-PK katalytickou subjednotku (DNA-PK<sub>CS</sub>) a dvě pevně spojené podjednotky Ku70 a Ku80. Podjednotky Ku dokážou vytvořit kruh s vysokou vazebnou afinitou kolem.[62] Při DSB se na zlomené konce DNA navážou DNA-PK<sub>CS</sub>, které autofosforylací aktivují opravu DNA.[63]



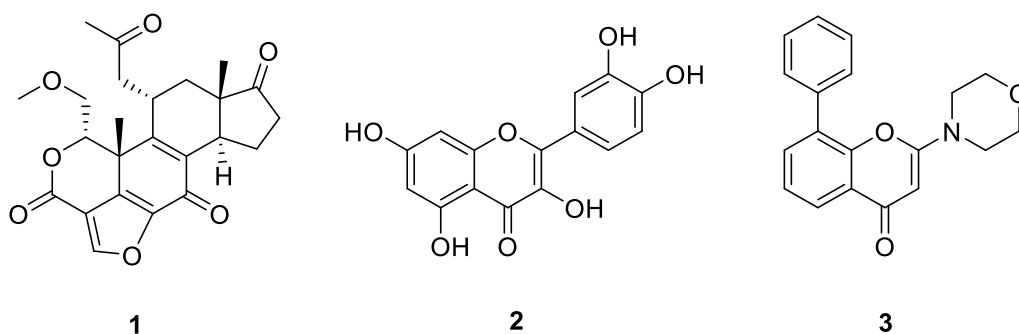


**Obrázek 5.** Systematické znázornění mechanismu odpovědi na poškození DNA.[64] ATM, ATR a DNA-PK jsou na vrcholu signální sítě. Aktivují se rychle v závislosti na poškození šroubovice DNA a následně aktivují celou řadu substrátů. Patří mezi ně především kinasy Chk1 a Chk2, které spolu rovněž fosforylují centrální regulátor a tumor supresorový protein p53, který následně vede k opravě DNA, zastavení buněčného cyklu inhibicí CDK1 a CDK2 nebo k apoptóze.

Jak již bylo řečeno, v reakci DSB se aktivují zejména DNA-PK a ATM, ATR je aktivován u SSB.[54] Tyto proteinkinasy působí přes různé mediátory a protein p53 na velké množství efektorů, jako například CDK, které jsou tímto způsobem inhibovány. Inhibice CDK zpomaluje nebo dokonce zcela zastavuje buněčný cyklus v kontrolních bodech, aby mohla být DNA před replikací či mitózou opravena. Zároveň se aktivují reparační postupy, které opraví poškozenou DNA. Opravy DSB se provádí dvěma mechanismy: homologní rekombinací (HR) zprostředkovanou ATM kinasou a nehomologním spojením konců (NHEJ) řízeným hlavně DNA-PK.[65, 66] Pokud je poškození DNA závažné, nasměrují tyto dráhy buňku k apoptóze.[54]

## 1.4 Inhibitory fosfatidylinositol-3-kinas příbuzných kinas

Prvním objeveným inhibítorem PI3K a PIKK byl fungální metabolit wortmannin (**1**, Obr. 6). Kvůli jeho nestabilitě, vysoké toxicitě a hlavně díky ireverzibilní neselektivní inhibici se dalšího klinického testování nezúčastnil.[67, 68] Velkým krokem vpřed byl objev syntetického specifického inhibítora 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-onu tzv. LY294002 (**3**), jenž strukturně vychází z kvercetinu (**2**), přírodně vyskytujícího se bioflavonoidu.[69]

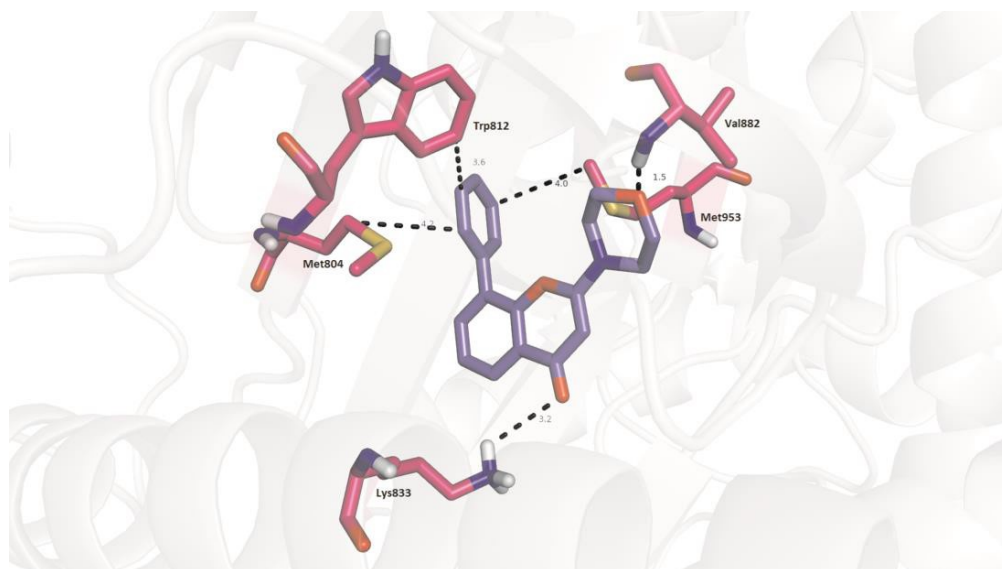


**Obrázek 6.** Struktury wortmanninu (**1**), kvercetinu (**2**) a LY294002 (**3**).

Výhodou LY294002 je jeho jednodušší molekula a mnohem specifitější inhibice PI3K. LY294002 inhibuje nejenom PI3K ale také související proteinkinasy DNA-PK, mTOR a dále několik nesouvisejících kinas jako je kaseinkinasa 2 (CK2) či glykogen synthasakinasa 3 (GSK3). Studie *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že LY294002 má řadu účinků: inhibice růstu buněk, zastavení buněčného cyklu ve fázi G1, anti-angiogenní aktivita a indukce radiosenzitivity. Problémem LY294002 je jeho špatná rozpustnost, nízká biodostupnost, rychlá metabolická degradace a v neposlední řadě i široké spektrum buněčných cílů, které by jistě znamenalo i mnoho nežádoucích účinků.[64]

LY294002 je kompetitivní inhibitor vazebného místa pro ATP na PI3K, které je velmi podobné i u příbuzných proteinkinasy jako mTOR nebo DNA-PK (Obr. 7). Nejdůležitější část struktury je tvořena morfolinovým kruhem, který vytváří vodíkovou vazbu s valinem v aktivním místě. Tato interakce kinasa-ligand hraje pak klíčovou roli v inhibici enzymu a představuje tak základní kámen ve vývoji nových inhibítora PI3K. Náhrada morfolinového kyslíku sírou, dusíkem, hydroxymethylovou skupinou či methylenovou skupinou vede k významné ztrátě afinity. Modifikace ostatních částí

struktury zpravidla nevede k tak výraznému snížení inhibice kinas, naopak jsou využitelné pro přípravu inhibitorů selektivních k jednotlivým členům PI3K i PIKK.[69] Strukturních obměn LY294002 bylo za účelem získání selektivních a účinných inhibitorů PI3K a PIKK provedeno mnoho. Nejčastěji se jedná o PI3K a mTOR inhibitory, přičemž nejnovější látky jsou originální struktury již velmi vzdáleny. Dále jsou připravovány inhibitory DNA-PK, které jsou LY294002 stále velmi strukturně podobné. Inhibitorů ATM a ATR je zatím velmi málo a většinou je jedná o struktury odlišného původu.[64]

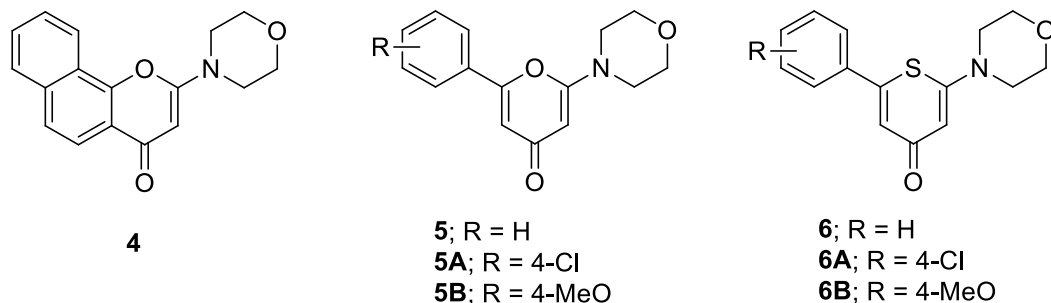


**Obrázek 7.** Molekulový model interakce inhibitoru LY294002 s aktivním místem PI3K, podjednotkou 110 $\gamma$ . Morfolinový kruh LY294002 je vodíkovou vazbou navázán s valinem (Val882). Chromonový cyklus napodobuje adeninový cyklus v ATP. Karbonylová skupina poskytuje vodíkovou vazbu s lysinem (Lys833) a fenyl je umístěn tak, že odpovídá ribose ATP.[64]

#### 1.4.1 DNA-PK inhibitory odvozené od LY294002

Většina DNA-PK inhibitorů je strukturně velmi podobná struktury LY294002. Mezi hlavní konstituční úpravy patří záměna chromonového jádra za jiný heterocyklus, který obsahuje karbonylový kyslík, nebo substituce fenylu jiným substituentem. Fúzí chromonového jádra s dalším benzenovým kruhem či minimalizací jádra dochází

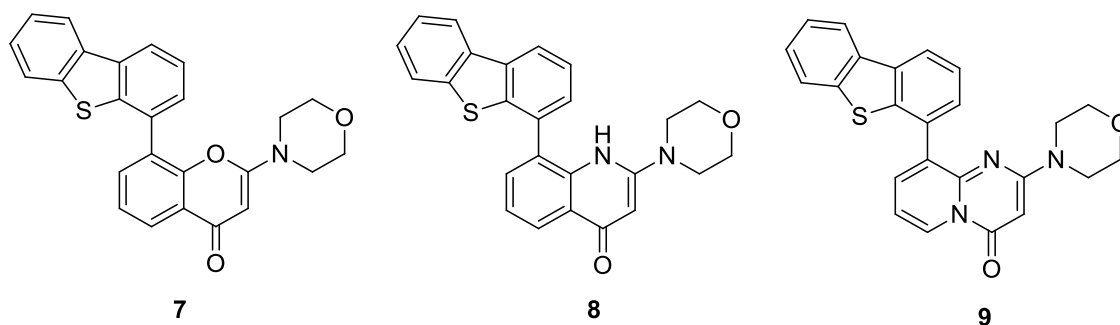
ke stejné inhibici DNA-PK. Sloučeniny tohoto typu pak mohou sloužit jako výchozí struktury dalšího výzkumu (Obr. 8).[70-72]



**Obrázek 8.** Struktury DNA-PK inhibitorů s rozšířeným a zjednodušeným jádrem.

Nejvýznamnějším derivátem s přikondenzovaným aromatickým cyklem je NU7026 (**4**). Tento derivát vykázal 50× vyšší selektivitu vůči DNA-PK oproti PI3K. Tento inhibitor zvyšoval cytotoxicitu způsobenou ionizujícím zářením, ale sám o sobě neměl na přežití buněk téměř žádný vliv.[71] Největším problémem molekuly NU7026 byla její nízká rozpustnost ve vodě a její rychlý metabolismus, hlavně oxidace a glukuronidace na C2 morfolinovém kruhu.[73] I tak tato látka poskytla velmi cenné informace pro další vývoj jak inhibitorů DNA-PK, tak i dalších látek ovlivňujících DDR.

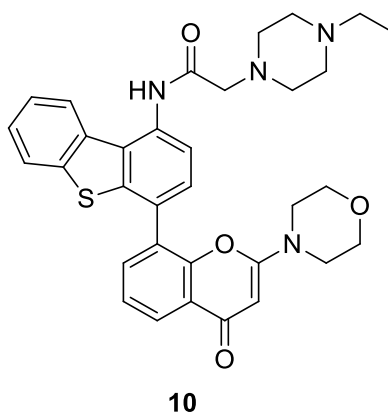
Minimalizace jádra nabízí více možností pro zavedení strukturální různorodosti v aromatické oblasti, proto byly tyto deriváty také hojně studovány. Jako výchozí jádra byly použity pyran-4-ony (**5**, **5A**, **5B**) a thiopyran-4-ony (**6**, **6A**, **6B**). Pyran-4-ony a thiopyran-4-ony s lipofilními arylovými substituenty měly srovnatelnou či vyšší inhibici DNA-PK v porovnání s LY294002. Oba deriváty mají velmi podobný profil účinků, nicméně pyran-4-ony mají tendenci být účinnější. Byly zkoumány i jiné polohy aromatických substituentů na jádrech látek **5** a **6**, avšak účinné byly jen deriváty se substitucí v poloze 6-.[70]



**Obrázek 9.** Struktury chromonových, chinolových a pyridopyrimidonových DNA-PK inhibitorů.

Nejvíce derivátů vychází přirozeně ze základního 2-morfolino-chromen-4-onu. Obdobně jako u předchozích látek, kde vykazovala účinek pouze substituce v poloze 6-, zde vykazovala účinek jen substituce v poloze 8-. Připojením dibenzothiofenu vznikl derivát NU7441 (7, Obr. 9), který inhiboval DNA-PK s hodnotou  $IC_{50}$  14nM a více než stonásobnou selektivitou nad PI3K. Sloučenina 7 byla podrobena dalším výzkumům, které ukázaly její silnou buněčnou radio- a chemo-senzibilizaci na různých nádorových buněčných liniích.[72, 74] Největším problémem NU7441 je jeho špatná rozpustnost ve vodě a nízká perorální biologická dostupnost.[75]

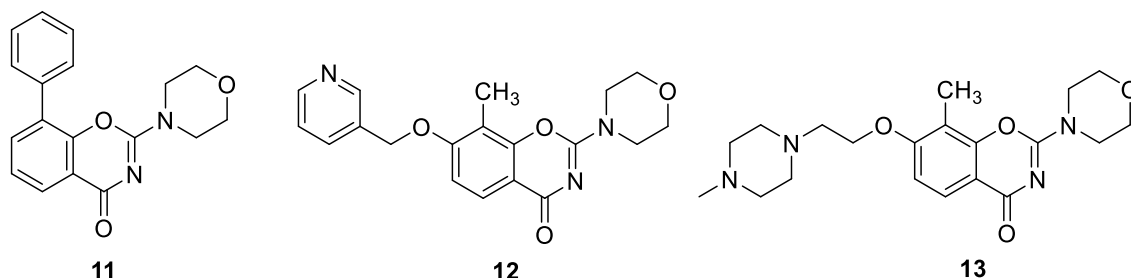
Struktura molekuly NU7441 se stala předlohou pro další sloučeniny s podobnými strukturálními rysy, jako jsou deriváty 8 a 9, které obsahují chinolin-4-on a pyridopyrimidin-4-on jako heterocyklická jádra. Biologické aktivity těchto derivátů byly velmi podobné s NU7441, jak z hlediska aktivity, tak z hlediska selektivity.[72, 76]



**Obrázek 10.** Struktura PI3K/DNA-PK inhibitoru KU-0060648 (10)

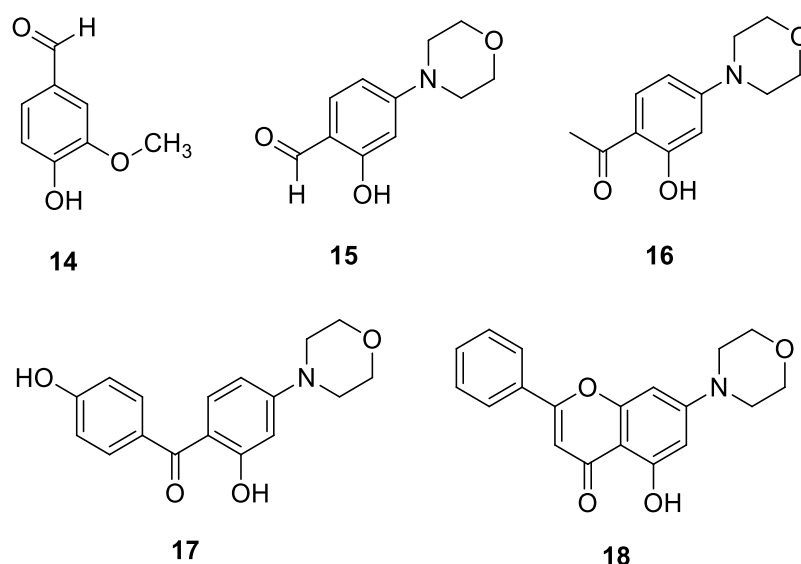
Z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě a nevyhovujícího farmakokinetického profilu byla snaha o modifikaci předchozích struktur připojením polárních substituentů.

Zavedením ethylpiperazinu přes acetamidový můstek vznikla molekula KU-0060648 (**10**, Obr. 10), která má vysokou potenci pro DNA-PK ( $IC_{50}$  5nM) a navíc působí velmi silně i na PI3K. To způsobuje inhibici růstu buněk, zvýšení cytotoxicity radiační terapie a zvýšení citlivosti buněk na inhibitory topoisomerasy II.[77]



**Obrázek 11.** Struktura inhibitorů DNA-PK s 1,3-benzoxazinovým heterocyklickým jádrem.

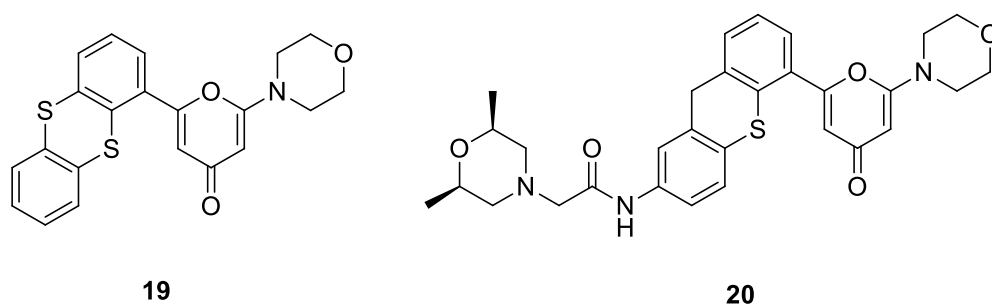
Další obměny spočívaly v přípravě derivátů s alternativními heterocyklickými jádry. Jedním z těchto derivátů je i 2-morfolino-8-fenyl-1,3-benzoxazin-4-on (**11**, Obr. 11). Jedná se o izoster LY294002, který vykazoval zvýšený inhibiční potenciál vůči DNA-PK než mateřská molekula. Modifikace této struktury probíhala trochu odlišně než u předchozích sloučenin. Vědci z La Trobe Univerzity v Austrálii modifikovali tuto molekulu převážně v poloze 7-. Tato samotná substituce vedla sice k derivátům s nízkou účinností, ale substituce methylovou skupinou v poloze 8- 1,3-benzoxazin-4-onu přinesla účinné deriváty **12** a **13**. Oba tyto inhibitory mají zvýšenou aktivitu vůči DNA-PK, nicméně sloučenina **12** je neselektivní a inhibuje stejnou měrou i PI3K, zatímco **13** je velmi selektivní k DNA-PK. To je pravděpodobně způsobeno rozdílem mezi pružnou strukturou methylpiperazinu a plochým pyridinem.[78, 79]



**Obrázek 12.** Struktury dalších morfolinových DNA-PK inhibitorů.

Další typy inhibitorů jsou již strukturně více odlišné od struktury LY294002 (Obr. 12). Základ struktury vychází z derivátu hydroxybenzaldehydu – vanilinu (**14**), což je přirozeně se vyskytující sloučenina, která má mírné inhibiční účinky na DNA-PK.[80] Počáteční strukturou byl arylmorfolin, 2-hydroxy-4-morfolin-4-yl-benzaldehyd (**15**) a modifikací této struktury vznikly molekuly **16**, **17**, **18** se vzrůstající aktivitou vůči DNA-PK a vyšší selektivitou právě vůči DNA-PK.[64]

#### 1.4.2 ATM inhibitory odvozené od LY294002

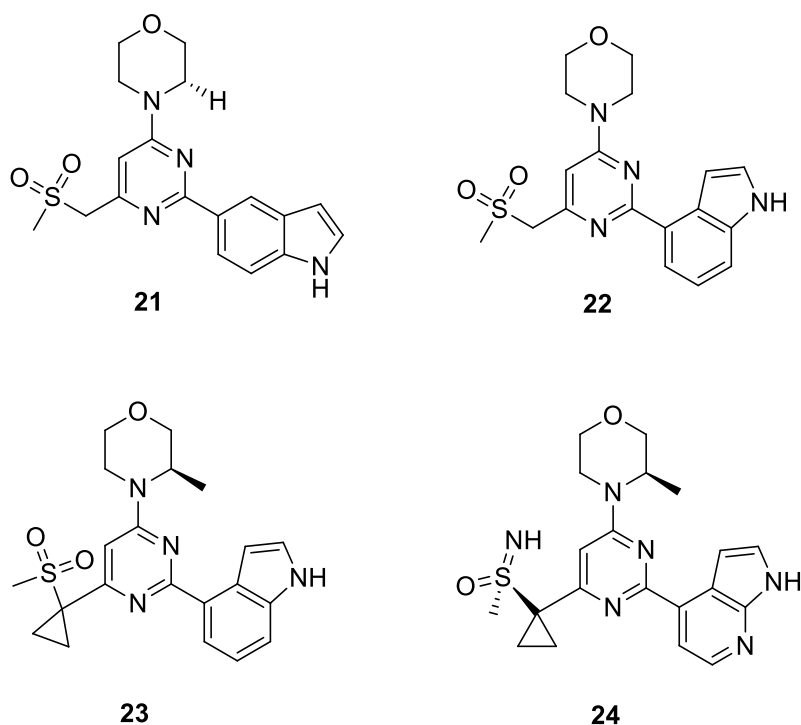


**Obrázek 13.** Struktury specifických inhibitorů ATM kinasy.

Při studiu pyranových inhibitorů DNA-PK byl také objeven první selektivní inhibitor ATM kinasy, KU-55933. Ze všech morfolinových derivátů pouze 1-thianthrenylový derivát (**19**, Obr. 13) vykazoval zvýšenou inhibici ATM, a to

až 100násobně oproti inhibici DNA-PK[81].Špatná rozpustnost a biologická dostupnost opět bránily dalšímu využívání a testování, proto se do struktury molekuly **19** zařadila 2,6-dimethylmorfolin-4-yl skupina do polohy 2 na thioxanthenu, což vedlo k derivátu KU-60019 (**20**), který má zvýšenou rozpustnost ve vodě. Byla zachována i preference k inhibici ATM kinasy (IC<sub>50</sub>hodnota 6 nM) a navíc získal 10× větší účinnost v radiosenzitizaci lidských gliových buněk oproti **19**. [82]

#### 1.4.3 ATR inhibitory odvozené od LY294002



**Obrázek 14.** Struktury pyrimidinových inhibitorů ATR kinasy.

Inhibitory ATR kinas jsou strukturně odlišné oproti DNA-PK a ATM inhibitorům a více se podobají inhibitorům mTOR, které v této diplomové práci nezmiňuji. Inhibitory mTOR i ATR kinasy se dají rozdělit na dvě hlavní větve: morfolinové a ty, kde hlavní vodíkovou vazbu s aktivním místem zprostředkovává jiný heterocyklus.[69] Morfolinové inhibitory ATR AZ20 (**23**) a AZD6738 (**24**) strukturně vychází z mTOR inhibitoru **21** (Obr. 14), kde došlo k náhradě 5-indolyl části molekuly za 4-indolyl (**22**). Tato změna byla pro inhibici ATR kinasy rozhodující a znamenala téměř kompletní potlačení inhibice mTOR. Dále byla modifikována methylenová jednotka v sulfonovém postranním řetězci a připojení 3(*R*)-methylu u morfolinového kruhu, který má pozitivní vliv jak na potenci, tak na mikrosomální stabilitu molekuly.



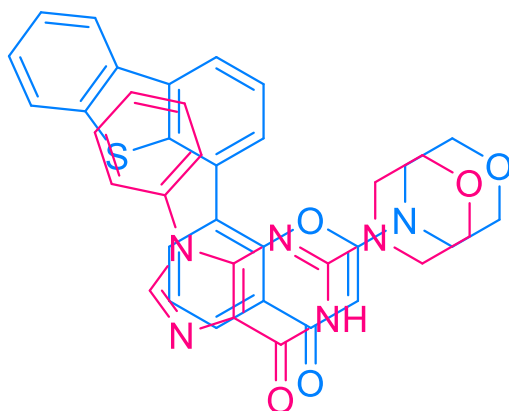
Takto vznikla látka AZ20 (**23**), selektivní a účinný inhibitor ATR kinasy.[83] Nedávno byl vyvinut zatím nejpokročilejší inhibitor AZD6738 (**24**), který opět spadá do morfolino-pyrimidinové kategorie. Má vysokou účinnost, selektivitu, vhodné farmakokinetické vlastnosti a nedávno vstoupila do klinického testování jak v monoterapii, tak v kombinaci s radioterapií.[84]

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1 Cíl práce a design nových inhibitorů

Cílem této práce je příprava jedné série nových inhibitorů DNA-PK. Plánované deriváty jsou strukturně podobné základnímu neselektivnímu inhibitoru LY294002, selektivnímu inhibitoru NU7441 (7) a jeho derivátům (8, 9). Podstata těchto nových inhibitorů bude využití 1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu, resp. 1,7-dihydro-6*H*-purin-6-onu jako centrálního heterocyklu místo chromonu a jeho derivátů. K tomuto heterocyklu bude připojen morfolin v poloze 2- a různé aromatické substituenty v polohách 7- a 9-. Celkem by mělo být připraveno 14 nových inhibitorů.

S purinem, jako centrálním heterocyklem, budou mít výsledné sloučeniny jinou geometrii, avšak aromatické substituenty zaujmou podobnou pozici jako u chromonových derivátů a díky více atomům dusíku, jakožto akceptorů vodíkových vazeb, také možnost dalších interakcí v kavitě aktivního místa, což může vést k zesílení účinku a zvýšení selektivity v rámci PIKK. Jednotlivé aromatické substituenty byly vybrány tak, aby byla zajištěna určitá rozmanitost. Budou použity jak malé substituenty (fenyl), různě substituované substituenty (3,4-dichlorofenyl), tak i objemné substituenty (dibenzothiofen), který se osvědčil při vývoji DNA-PK inhibitorů.



**Obrázek 15.** Ukázka vzájemného překrytu molekuly NU7441 a obecné struktury plánovaných mých derivátů.

## 2.2 Syntetická část

### 2.2.1 Obecné technické metody

TLC byla prováděna na hliníkových destičkách pokrytých silikagelem 60 F254 (Merck, Praha, ČR). Sloupcová chromatografie probíhala za atmosférického tlaku na silikagelu 100 (velikost částic 0,063–0,200 mm, 70–230 mesh ASTM, Fluka, Praha, ČR).

Pro měření hmotnostních spekter byl využit analytický systém Dionex Ultimate 3000 LC-MS spojený se spektrometrem Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo). Systém LC-MS se skládá z binárního čerpadla HHG-3400RS, které je spojené s vakuovým odplyňovačem. Dále z vyhřívaného sloupcového kompartmentu TCC-3000, autosampleru WTS-3000 a ultrafialového detektoru VWD-3000. Kvadrupolový hmotnostní spektrometr byl vybavený elektron-sprejovým ionizačním zdrojem a data byly zaznamenávána v pozitivním módu s následujícími parametry: sprejové napětí bylo 3,2 kV, kapilární teplota byla 350 °C, teplota plynu byla 300 °C.

$^1\text{H}$ -NMR a  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra byla změřena pomocí Varian S500 spektrometru (500 a 126 MHz) nebo Varian Mercury-Vx BB 300 (300 a 75 MHz) v  $\text{CD}_3\text{OD}$  nebo  $\text{DMSO-}d_6$ . Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty  $\delta$  v ppm a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (3,30 pro  $^1\text{H}$ , 49,00 pro  $^{13}\text{C}$  v  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 2.50 pro  $^1\text{H}$ , 39.7 pro  $^{13}\text{C}$  v  $\text{DMSO-}d_6$ ). Multiplicity spinů jsou označeny jako s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu), t (triplet) nebo m (multiplet).

Mikrovlnný ohřev byl prováděn systémem Discover SP (CEM Corp., USA) s autosamplérem Explorer Hybrid 6/12.

Teploty tání byly změřeny pomocí bodotávku M-565 od firmy BÜCHI LabortechnikAg.

### 2.2.2 Obecný postup syntézy

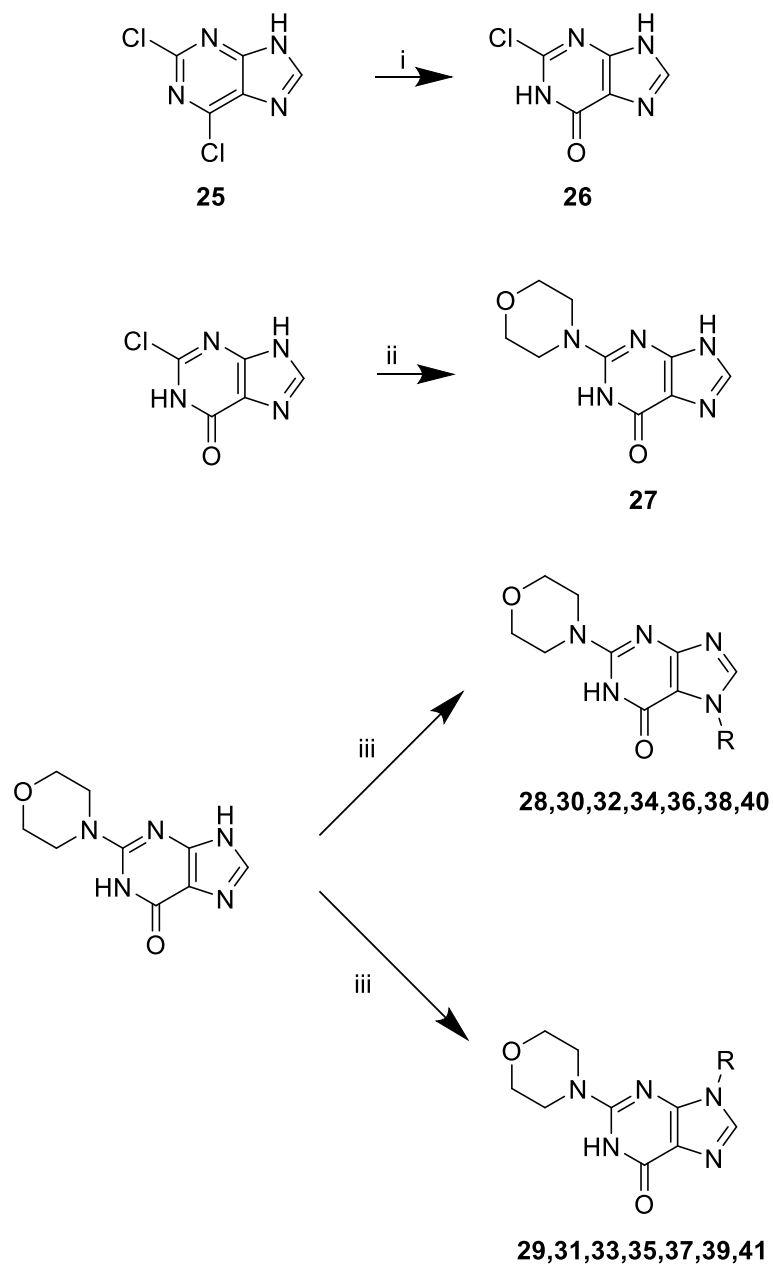
Příprava cílových inhibitorů se ukázala být velmi náročná. Nejprve bylo nutné hydrolyzovat výchozí látku 2,6-dichlor-9*H*-purin (**25**, Schéma 1) na 2-chlor-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (**26**) pomocí 1M roztoku NaOH. Bohužel byl produkt dobře rozpustný pouze ve vodě nebo v methanolu a tudíž se velmi obtížně čistil od vzniklých solí. Jako nejlepší způsob se ukázalo čištění sloupcovou chromatografií s ethanolem jako mobilní fází. Ve druhém kroku byl pomocí mikrovlnného záření připojen morfolinový cyklus. Produkt musel být čištěn opět sloupcovou chromatografií a dále překrytalizován k odstranění nezreagovaného morfolinu. Poté byly připojovány aromatické substituenty.

Bylo provedeno několik různých pokusů o připojení aromatického substituentu jak na výchozí látku 2,6-dichlor-9*H*-purin (**25**), tak na 2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (**27**). Kromě jednoho postupu (viz dále) byly všechny neúspěšné nebo probíhaly s velmi malými výtěžky.

Zprvu jsem začala regioselektivní arylací **25** do polohy 9-, která byla pro mne primárním cílem. Jednalo se o reakci pomocí Cu(OAc)<sub>2</sub>, fenantrolinu, molekulových sít a arylboronových kyselin.[85] Reakce byla úspěšná, ale s nízkými výtěžky (kolem 30 %). Navíc byly produkty velmi špatně rozpustné ve vodě, což znemožnilo potřebnou hydrolyzu. Proto byla sloučenina **25** nejprve hydrolyzována pomocí 1M NaOH a poté byl připojen morfolinový cyklus za vzniku meziprojektu **27**. Tyto reakce probíhaly velmi dobře, nicméně produkty byly velmi dobře rozpustné ve vodě, a proto bylo obtížné je separovat od vzniklých solí. Bohužel, připojení arylu pomocí výše popsané reakce s touto výchozí látkou (VL) **27** neprobíhalo. Vyzkoušela jsem několik dalších přístupů.[86-91]

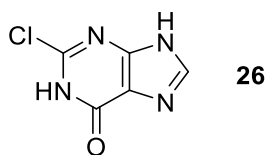
Jako nejlepší způsob se ukázala reakce s arylboronovými kyselinami, CuI, tetramethylethyldiaminem (TMEDA) v suchém methanolu za probublávání kyslíkem.[92] Při reakci vznikaly produkty s arylací v poloze 7- nebo 9-. Jednotlivé izomery byly od sebe odděleny sloupcovou chromatografií a jejich struktura byla potvrzena 2D nukleární magnetickou rezonancí. Izomer s arylací v poloze 7- byl majoritní a byl při sloupcové chromatografii eluován jako první.

### 2.2.3 Syntéza purinových inhibitorů DNA-PK



**Schéma 1.** Syntéza derivátů 2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu s aromatickými substituenty v polohách 7- a 9-. Reakční podmínky: i) 1M NaOH, 100 °C; ii) morfolin, *terc*-butanol, 110 °C, 200 W, 300 psi; iii) arylboronová kyselina, CuI, TMEDA, MeOH, O<sub>2</sub>, r.t.

### Syntéza 2-chlor-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu (**26**)



2,6-dichlor-9*H*-purin (**25**; 2 g; 10,58 mmol) byl za míchání a pod zpětným chladičem zahříván ve vroucím 1M roztoku NaOH (40 ml) po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs neutralizována pomocí 2M HCl, odpařena, sušena a čištěna sloupcovou chromatografií s ethanolem jako mobilní fází.

Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 89 %, 1,6 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  13,18 (bs, 1H), 8,18 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  155,88, 153,95, 142,71, 141,62, 117,45.

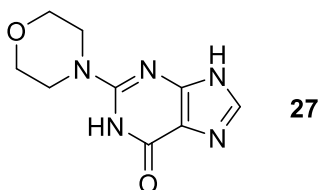
Chemický vzorec:  $\text{C}_5\text{H}_3\text{ClN}_4\text{O}$

Přesná molekulová hmotnost: 170,5560

ESI-HRMS:  $m/z$  171,0067  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_5\text{H}_4\text{ClN}_4\text{O}]^+$  171,0068)

Teplota tání:  $> 300$  °C.

### Syntéza 2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu (**27**)



2-chlor-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (**26**; 1,0 g; 5,88mmol) byl dán do zkumavky s morfolinem (1,54 ml; 17,64mmol) a *tert*-butanolem (10 ml). Reakce byla provedena pod mikrovlnným zářením při teplotě 110 °C, výkonu 200 W, maximálním tlakem 300 psi po dobu 1 hodiny. *Terc*-butanol byl poté odpařen a produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:methanol 9:1. Produkt byl překrytalizován z fáze methanol/diethylether pro odstranění zbytku morfolinu.

Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 91 %, 1,18 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,88 (s, 1H), 3,83 – 3,79 (m, 4H), 3,62 – 3,58 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  154.47, 145.79, 135.72, 120.45, 104.27, 67.35, 47.18.

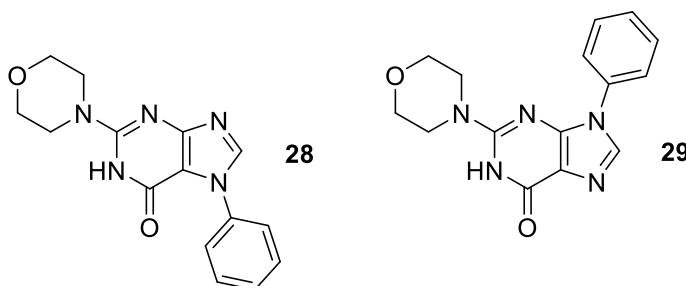
Chemický vzorec:  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$

Přesná molekulová hmotnost: 221,2200

ESI-HRMS:  $m/z$  222,0985  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2]^+$  222,0986)

Teplota tání:  $> 300$  °C.

**Syntéza 7-fenyl-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-onu (28) a 9-fenyl-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-onu (29)**



Pod kyslíkovou atmosférou byl v 5 ml suchého methanolu za pokojové teploty míchán jodid měďný (86 mg; 0,452 mmol) s TMEDA (68  $\mu\text{l}$ ; 0,452 mmol). Po 15 minutách byl do modrého roztoku přidán 2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (27; 0,20 g; 0,904 mmol) a fenyloboronová kyselina (0,22 g; 1,808 mmol). Reakce byla zahřívána na 60 °C do úplného vymizení výchozí látky 27 (48 hodin). Pomocí TLC byl průběh reakce průběžně kontrolován. Reakční směs byla poté odpařena a jednotlivá analoga 28 a 29 byla oddělena sloupcovou chromatografií, za použití mobilní fáze chloroform:methanol 40:1. Analog se substituentem v poloze 7- (28) byl majoritní a z kolony eluován jako první.

### **7-fenyl-2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (28)**

Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 41 %, 0,11 g

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz) δ 11,25 (bs, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,62 – 7,57 (m, 2H), 7,51 (dd, *J* = 8,6, 7,0 Hz, 2H), 7,46 – 7,39 (m, 1H), 3,69 – 3,65 (m, 4H), 3,58 – 3,52 (m, 4H).

Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze <sup>1</sup>H spektrum.

Chemický vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Přesná molekulová hmotnost: 297,3180

ESI-HRMS: *m/z* 298,1299 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 298,1299)

Teplota tání: > 300 °C.

### **9-fenyl-2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (29)**

Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 19 %, 0,05 g

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz) δ 11,18 (bs, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,55 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,41 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,73 – 3,59 (m, 4H), 3,58 – 3,46 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz) δ 157,99, 153,41, 150,08, 137,62, 135,57, 129,92, 127,75, 123,35, 118,01, 66,01, 45,85.

Chemický vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Přesná molekulová hmotnost: 297,3180

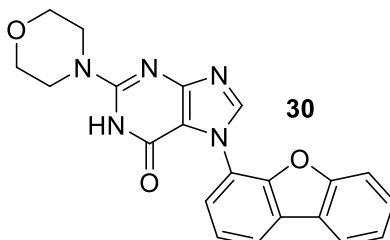
ESI-HRMS: *m/z* 298,1294 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 298,1299)

Teplota tání: > 300 °C.



Analogickým způsobem byly připraveny následující deriváty, jejichž charakterizace je uvedena:

**7-(dibenzo[*b,d*]furan-4-yl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (30)**



Vzhled: běžová pevná látka

Výtěžek: 29 %, 0,10 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  8,45 (s, 1H), 8,28 – 8,22 (m, 2H), 7,73 – 7,68 (m, 2H), 7,58 – 7,52 (m, 2H), 7,48 – 7,43 (m, 1H), 3,70 – 3,66 (m, 4H), 3,58 – 3,53 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  159,87, 156,06, 154,85, 153,36, 149,69, 144,92, 128,64, 125,65, 125,32, 124,10, 123,79, 123,75, 121,98, 121,66, 121,24, 112,45, 109,75, 66,12, 46,37.

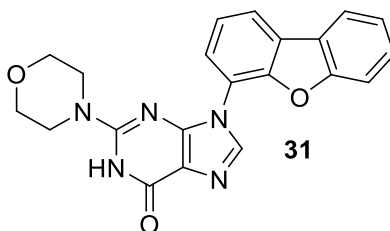
Chemický vzorec:  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$

Přesná molekulová hmotnost: 387,3990

ESI-HRMS:  $m/z$  388,1395  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3]^+$  388,1404)

Teplota tání: > 300 °C.

**9-(dibenzo[*b,d*]furan-4-yl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (31)**



Vzhled: běžová pevná látka

Výtěžek: 14 %, 0,05 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  8,28 (s, 1H), 8,27 – 8,22 (m, 2H), 7,85 (dd,  $J = 7,9, 1,2$  Hz, 1H), 7,76 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,58 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,50 – 7,44 (m, 1H), 3,61 – 3,57 (m, 4H), 3,49 – 3,45 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  157,96, 156,05, 153,43, 150,91, 149,04, 138,61, 128,79, 126,06, 124,53, 124,16, 124,13, 123,65, 122,01, 121,42, 119,95, 117,33, 112,45, 65,94, 45,79.

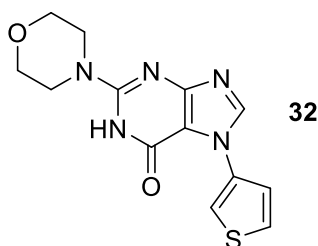
Chemický vzorec:  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$

Přesná molekulová hmotnost: 387,3990

ESI-HRMS:  $m/z$  388,1395  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3]^+$  388,1404)

Teplota tání:  $> 300$  °C.

### 2-morfolino-7-(thiofen-3-yl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (32)



Vzhled: běžová pevná látka

Výtěžek: 47 %, 0,13 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  11,27 (bs, 1H), 8,40 (d,  $J = 6,4$  Hz, 1H), 8,01 – 7,89 (m, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,51 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 3,72 – 3,58 (m, 4H), 3,56 – 3,46 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  160,24, 155,03, 153,20, 144,11, 134,57, 126,81, 124,32, 117,18, 108,61, 66,09, 46,31.

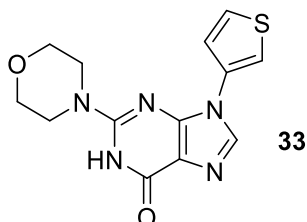
Chemický vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Přesná molekulová hmotnost: 303,3400

ESI-HRMS:  $m/z$  304,0863  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+$  304,0863)

Teplota tání: > 300 °C.

**2-morfolin-9-(thiofen-3-yl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (33)**



Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 4 %, 0,012 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  11,17 (bs, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,06 – 8,00 (m, 1H), 7,77 – 7,66 (m, 3H), 3,70 – 3,64 (m, 4H), 3,64 – 3,56 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum.

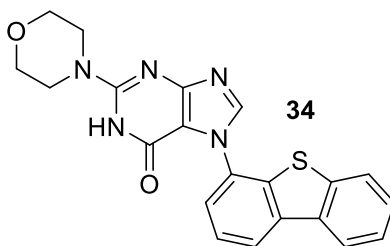
Chemický vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Přesná molekulová hmotnost: 303,3400

ESI-HRMS:  $m/z$  304,0863  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+$  304,0863)

Teplota tání: > 300 °C.

**7-(dibenzo[*b,d*]thiofen-4-yl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (34)**



Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 44 %, 0,16 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  11,24 (bs, 1H), 8,51 (dd,  $J = 7,1, 1,9$  Hz, 1H), 8,48 – 8,45 (m, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,04 – 8,01 (m, 1H), 7,71 – 7,65 (m, 2H), 7,60 – 7,54 (m, 2H), 3,70 – 3,66 (m, 4H), 3,57 – 3,53 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum.

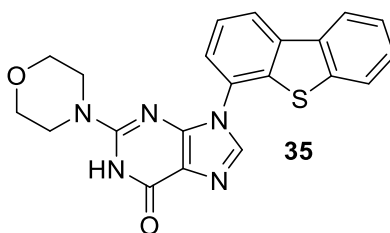
Chemický vzorec:  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Přesná molekulová hmotnost: 403,4600

ESI-HRMS:  $m/z$  404,1169  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+$  404,1176)

Teplota tání: > 300 °C.

### 9-(dibenzo[*b,d*]thiofen-4-yl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (35)



Vzhled: běžová pevná látka

Výtěžek: 9 %, 0,003 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  8,52 (dd,  $J = 7,3, 1,7$  Hz, 1H), 8,49 – 8,44 (m, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,08 – 8,02 (m, 1H), 7,74 – 7,67 (m, 2H), 7,60 – 7,55 (m, 2H), 3,59 – 3,54 (m, 4H), 3,46 – 3,41 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum.

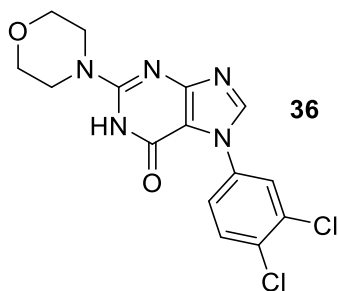
Chemický vzorec:  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Přesná molekulová hmotnost: 403,4600

ESI-HRMS:  $m/z$  404,1169  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+$  404,1176)

Teplota tání: > 300 °C.

**7-(3,4-dichlorfenyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (36)**



Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 12 %, 0,04 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  8.40 (s, 1H), 8.01 – 7.98 (m, 1H), 7.83 – 7.77 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 3.68 – 3.64 (m, 4H), 3.57 – 3.52 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum.

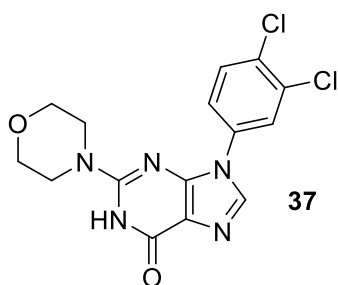
Chemický vzorec:  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2$

Přesná molekulová hmotnost: 366,2020

ESI-HRMS:  $m/z$  366,0523  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2]^+$  366,05129)

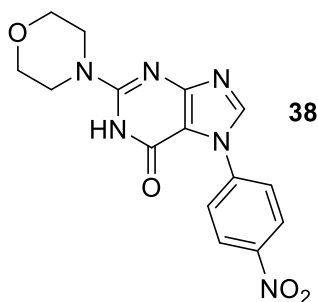
Teplota tání: > 300 °C.

**9-(3,4-dichlorfenyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (37)**



Látku se nepodařilo izolovat v dostatečném množství ani v dostatečné čistotě.

**2-morfolino-7-(4-nitrofenyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (38)**



Vzhled: žlutá pevná látka

Výtěžek: 23 %, 0,07 g

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz)  $\delta$  11,38 (bs, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,36 (dd,  $J = 8,9, 1,4$  Hz, 2H), 7,91 (dd,  $J = 8,7, 2,0$  Hz, 2H), 3,69 – 3,61 (m, 4H), 3,60 – 3,51 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum.

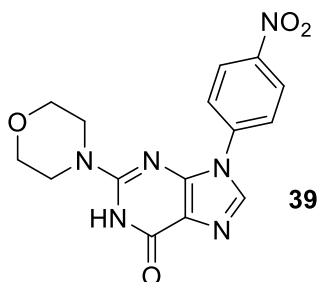
Chemický vzorec:  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4$

Přesná molekulová hmotnost: 342,3150

ESI-HRMS:  $m/z$  343,1147  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4]^+$  343,1149)

Teplota tání: > 300 °C.

**2-morfolino-9-(4-nitrofenyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (39)**



Vzhled: žlutá pevná látka

Výtěžek: 10 %, 0,03 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  11,36 (bs, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,39 – 8,34 (m, 2H), 7,95 – 7,90 (m, 2H), 3,69 – 3,64 (m, 4H), 3,58 – 3,53 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  164,38, 161,00, 154,69, 153,17, 146,10, 144,56, 140,65, 121,97, 107,82, 65,79, 45,96.

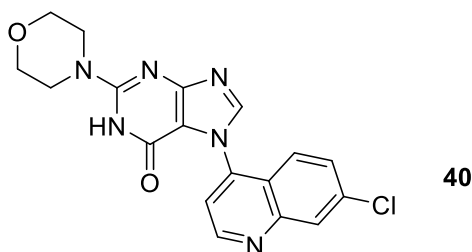
Chemický vzorec:  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4$

Přesná molekulová hmotnost: 342,3150

ESI-HRMS:  $m/z$  343,1147  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4]^+$  343,1149)

Teplota tání: > 300 °C.

#### 7-(7-chlorchinolin-4-yl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (40)



Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek: 29 %, 0,12 g

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz)  $\delta$  11.29 (s, 1H), 9.09 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.24 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 2H), 3.70 – 3.64 (m, 4H), 3.58 – 3.53 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz)  $\delta$  160.19, 154.75, 153.48, 152.60, 149.37, 145.23, 140.86, 135.40, 128.81, 128.23, 125.78, 123.39, 119.83, 110.54, 66.11, 46.35.

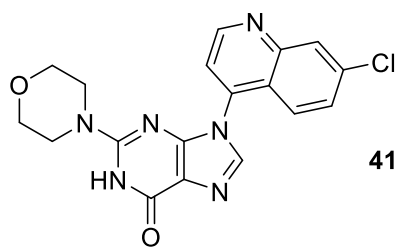
Chemický vzorec:  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_6\text{O}_2$

Přesná molekulová hmotnost: 382,8080

ESI-HRMS:  $m/z$  383.1012  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClN}_6\text{O}_2]^+$  383.1018)

Teplota tání: > 300 °C.

#### 9-(7-chlorchinolin-4-yl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (41)



Látku se nepodařilo izolovat v dostatečném množství ani v dostatečné čistotě.



## 2.3 Biologická část

Biologické testování probíhalo na Katedře lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, pod vedením profesorky Řezáčové. Cílem bylo analyzovat antiproliferativní a chemosenzibilizační vlastnosti nově syntetizovaných DNA-PK inhibitorů v kombinaci s chemoterapeutikem doxorubicinem (DOX) na devíti různých lidských nádorových a jedné nenádorové buněčné linii. Testováno bylo 9 inhibitorů (molekuly **28 – 36**). Látky **37 – 41** nebyly do testování zařazeny z důvodu jejich velmi špatné rozpustnosti jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech.

### 2.3.1 Materiály a metody

#### 2.3.1.1 Buněčná kultivace a ošetření

Vybraných 10 lidských buněčných linií – Jurkat (akutní leukémie T-buněk), A2780 (karcinom vaječníků), A549 (karcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), AGS (žaludeční adenokarcinom), PANC-1 (pankreatické epiteloidní karcinom), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MDF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (plicní fibroblast) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a byly kultivovány podle pokynů poskytovatele kultivačních metod. Každá buněčná linie se naočkovala na dříve stanovenou optimální hustotu (500 do  $30 \cdot 10^3$  buněk na jamku) na 96 jamkové destičce a buňky se nechaly přes noc usadit. Deriváty, které měly být testovány, byly rozpuštěny v DMSO na zásobní roztoky (10 mmol/l). Pro experimenty byl zásobní roztok zředěn vhodným kompletním kultivačním médiem pro dosažení konečné koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$ .

Buňky byly vystaveny inhibitorům (o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ ) samostatně nebo v kombinaci s doxorubicinem po dobu 48 hodin. Koncentrace DOX (Sigma-Aldrich, USA) byla vybrána stanovením hodnoty IC<sub>50</sub> pro každou z buněčných linií. Doxorubicin byl použit v koncentračním rozmezí 0,05 až 1  $\mu\text{mol/l}$ . Jurkat, A2780 byly vystaveny 0,05  $\mu\text{mol/l}$  DOX, A549, AGS, HeLa 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , HT-29, SAOS-2, MCF-7. MRC-5 0,2  $\mu\text{mol/l}$  a PANC-1 1  $\mu\text{mol/l}$  DOX. Buňky byly také vystaveny standardním

inhibitorům DNA-PK NU7441 a NU7026 v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$  v tomto pořadí. Maximální koncentrace DMSO v kultivačním médiu byla 0,1 %.

### 2.3.1.2 Stanovení buněčné proliferace a procentuální výpočet růstu

Reakční činidlo WST-1 (Roche, Mannheim, Německo) bylo použito pro určení cytotoxického účinku testovaných látek. Na konci kultivačního období byl WST-1 test proveden v souladu s protokolem výrobce. Absorbance byla měřena pomocí TecanInfiniteM200 spektrometru (Tecan Group, Mannedorf, Švýcarsko). Každá hodnota je průměr tří nezávislých experimentů a představuje procento proliferace kontroly neošetřených buněk (100 %).

Procentuální hodnota růstu (growth percent, GP) byla vypočtena pro každý testovaný inhibitor. GP představuje střední hodnotu poklesu životaschopnosti v procentech u všech deseti buněčných linií, ošetřených stejným inhibitorem.

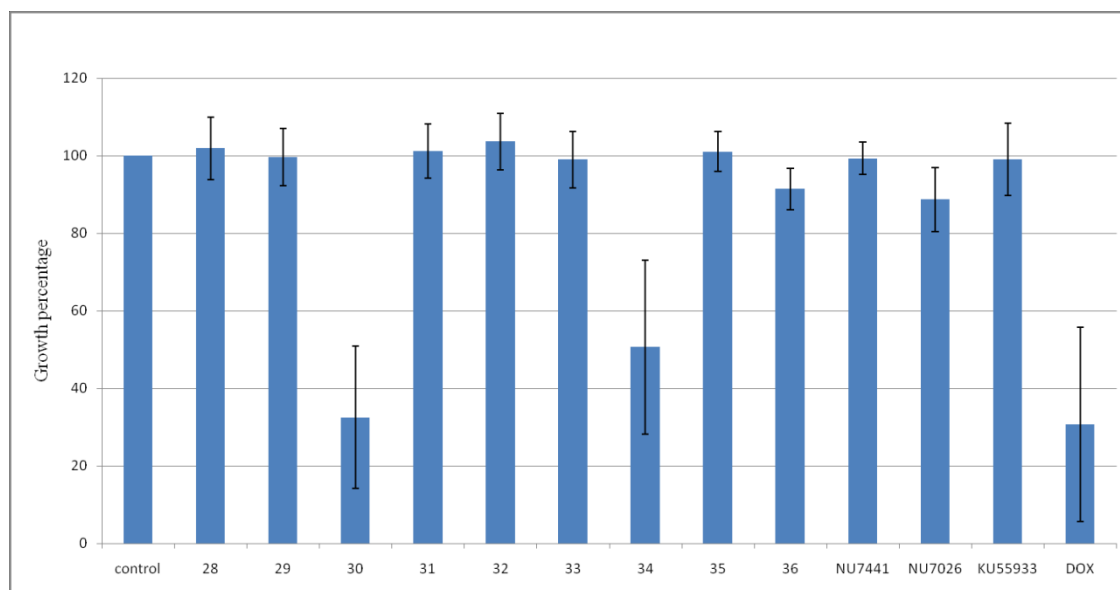
### 2.3.2 Výsledky biologického testování

#### 2.3.2.1 Antiproliferativní vlastnosti inhibitorů

Zpočátku byl testován inhibiční účinek každé sloučeniny samostatně. Na 10 lidských buněčných liniích bylo testováno 10 inhibitorů v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a standardní inhibitory DNA-PK NU7441 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) a NU7026 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a ATM inhibitor KU55933 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Doxorubicin v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  byl použit jako pozitivní kontrola.

Buněčné linie byly vystaveny těmto látkám po dobu 48 hodin a následně byla testována jejich životaschopnost. Proliferace buněk byla stanovena pomocí WST-1 testu proliferace, vztahující se k proliferaci neošetřených kontrolních buněk (100 %). Výsledky ukázaly, že 7 testovaných inhibitorů aplikovaných samostatně nemělo žádný cytotoxický účinek na všech 10 buněčných liniích. Procento životaschopných buněk se pohybovalo v rozmezí 73 – 121 %. U dvou inhibitorů – **30** a **34** byla pozorována značně snížená životaschopnost buněk. Inhibitor **30** byl cytotoxický nejvíce, vykazoval snížení

životaschopnosti pod 50 % u 8 buněčných linií, kde procento životaschopných buněk kolísalo v rozmezí 4 – 48 %. Pro vyjádření obecného antiproliferativního působení byla použita hodnota GP, což je střední hodnota procentuálního snížení životaschopnosti všech testovaných buněčných linií po působení stejným inhibítorem (Obr. 16). Podrobná data ohledně jednotlivých působení inhibitorů na buněčné linie jsou uvedena v **Příloze 1**.



**Obrázek 16.** Grafické znázornění průměrných hodnot GP jednotlivých inhibitorů i standardů u deseti buněčných linií.

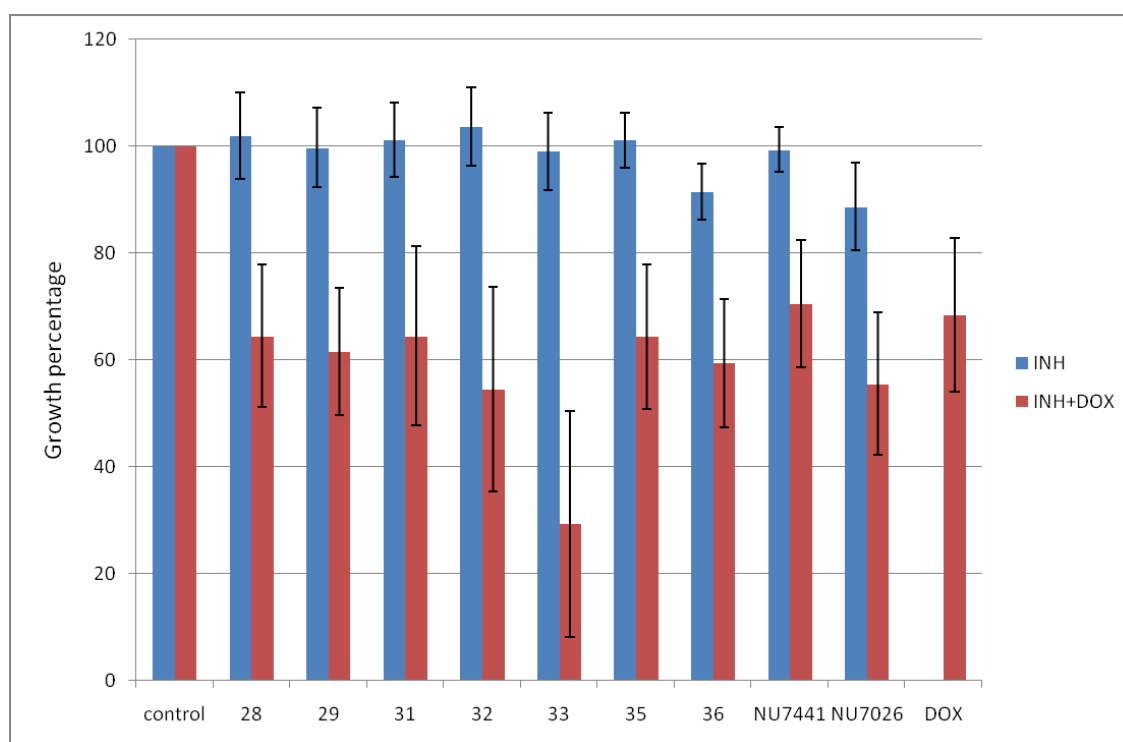
### 2.3.2.2 Chemosenzibilizační vlastnosti inhibitorů

Dále byly testovány chemosenzibilizační vlastnosti inhibitorů. Testování bylo provedeno opět na 10 lidských buněčných liniích (9 nádorových a 1 nenádorové) se 7inhibitory a standardy NU7441, NU7026 a KU-55933 samostatně a v kombinaci s vhodnými dávkami DOX. Látky **30** a **34** byly v důsledku cytotoxicity z tohoto testování vyloučeny. Pro vyjádření celkové inhibiční aktivity každého inhibitoru byla opět vypočtena procentuální hodnota růstu (GP, Obr. 17).

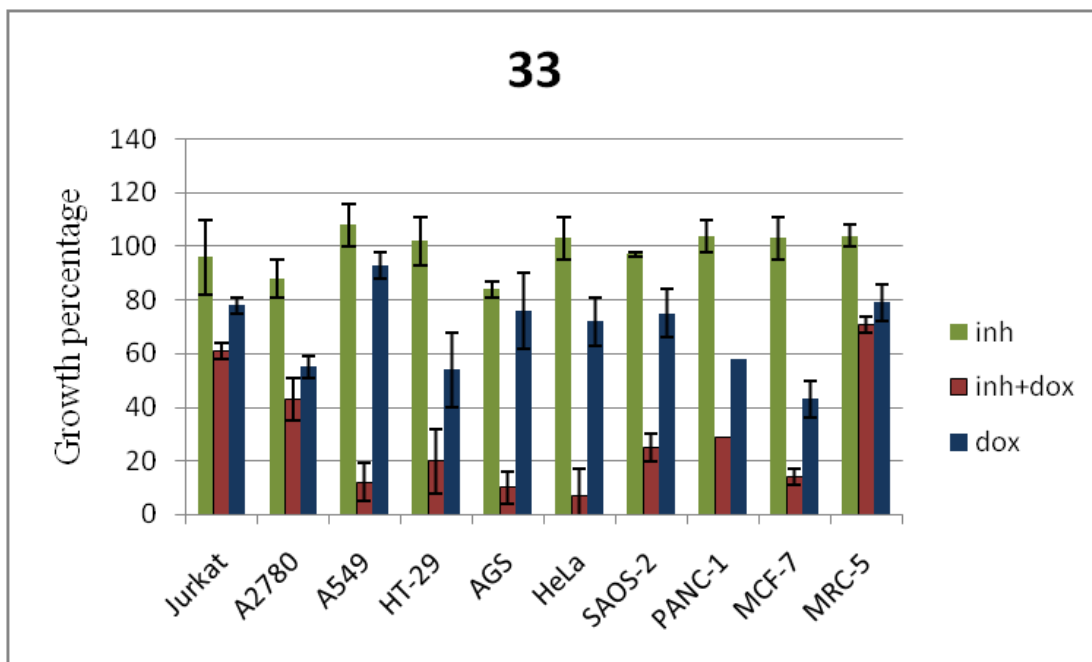
Výrazná chemosenzibilizace buněčných linií vůči DOX byla prokázána pouze u látky **33** (obr. 17 a 18). Kombinace tohoto inhibitoru s DOX vedla k výraznému

snížení životaschopnosti téměř všech nádorových buněk (výsledné GP 29) ve srovnání se samotným účinkem doxorubicinu jehož GP bylo 68. Nejcitlivější nádorové linie byly HeLa, AGS, A549, nižší účinek byl pozorován u leukemických buněk Jurkat a buněk karcinomu vaječníků A2780. Buňky plicních fibroblastů MRC-5 nebyly naším inhibítorem téměř vůbec ovlivněny. Podrobná data jednotlivých měření jsou uvedena v tabulce v **Příloze 2**.

Bohužel nemůžu tyto výsledky porovnat se standardním DNA-PK inhibítorem NU7441. Při testování nebylo možné připravit roztok NU7441 v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ , bez navýšení procenta DMSO. Proto byl tento inhibitor použit v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ . Při této koncentraci ale tato látka nevyvolala téměř žádný účinek. Mám tedy pouze srovnání s inhibítorem DNA-PK starší generace – NU7026, který již byl použit v koncentraci stejné, jako mé inhibitory a ATM inhibítorem KU-55933. Z obrázku 17 je patrné, že látka 33 sensibilizuje nádorové linie silněji než standard NU7026.



**Obrázek 17.** Chemosenzibilizační vlastnosti inhibitorů vyjádřené jako průměr GP samostatně a v kombinaci s doxorubicinem.



**Obrázek 18.** Chemosenzibilizační působení nejúčinnějšího inhibitoru – látky **33** samostatně i v kombinaci s doxorubicinem

### 3 DISKUZE

Samotná syntéza inhibitorů se ukázala být velmi náročná. Hlavním problémem bylo připojení aromatických substituentů na purinový skelet. Na vytvoření takové C-N vazby existuje mnoho způsobů. Dají se k tomu využít aryl halidy i boronové kyseliny a nejčastěji jsou katalyzovány pomocí komplexů mědi nebo paladia.[85-91]

Zprvu jsme začínali s navazováním aromatických substituentů na 2,6-dichlorpurin (**25**). První, částečně úspěšný způsob, byla regioselektivní arylace v poloze 9- pomocí  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ , fenantrolinu, molekulových sít a arylboronových kyselin. Při této reakci se nám podařilo připravit 9-arylované 2,6-dichlorpuriny. Poloha 9- byla pro mě žádoucí, protože více napodobuje známé DNA-PK inhibitory než poloha 7-, od které jsem žádnou aktivitu neočekávala. Ač reakce podle TLC probíhala kompletně, výtěžky se díky obtížné izolaci produktu z reakční směsi pohybovaly jen okolo 30 % a ani různé pokusy o optimalizaci nevedly ke větším výtěžkům.

Získané produkty byly bohužel prakticky nerozpustné ve vodě, a tudíž se hydroxidem nedaly účinně hydrolyzovat. Bylo tedy nutné nejprve připravit 2-(morfolino)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (**27**). Hydrolyza 2,6-dichlor-9*H*-purinu hydroxidem byla rychlá a kompletní, ale díky velmi dobré rozpustnosti 2-chlor-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu ve vodě jsme museli tento produkt izolovat pomocí sloupcové chromatografie s EtOH jako mobilní fází, aby došlo k odstranění anorganických látek. Následné připojení morfolinového cyklu již bylo bez komplikací a s vysokým výtěžkem > 90 %.

Arylace purin-6-onového skeletu pomocí regioselektivní arylace, která byla použita pro 2,6-dichlor-9*H*-puriny, bohužel v tomto případě již nefungovala. Bylo vyzkoušeno mnoho způsobů, (viz. Kapitola 2.2.2) od klasických metod za použití aryl halidů i boronových kyselin, sloučenin mědi ( $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  nebo  $\text{CuI}$ ), ligandů (prolin, fenantrolin, triethylamin a TMEDA). Dále byly použity i méně časté metody, například s použitím benzoové kyseliny či komplexu  $\text{KF} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ . Bohužel tyto reakce byly většinou neúspěšné, nebo vedly k pouze velmi nízkým výtěžkům. Až reakce boronových kyselin s  $\text{CuI}$  a TMEDAv suchém MeOH a v kyslíkové atmosféře probíhala úspěšně.

Byly získány 2 izomery v přibližném poměru 2:1 se souhrnnými výtěžky od 30 do 60 %. První izomer byl snadno získán sloupcovou chromatografií, izolace druhého izomeru byla složitější, převážně díky jeho menšímu množství a časté kontaminaci prvním izomerem. Pomocí 2D NMR experimentů bylo zjištěno, že první a majoritní izomer byl derivát s navázaným aromatickým substituentem v poloze 7- a druhý měl substituent navázaný v poloze 9-. To bylo pro překvapení, protože u původního 2,6-dichlorpurinu se substituenty vázaly preferenčně do polohy 9-. Bohužel byly pro mou práci důležitější deriváty se substitucí v poloze 9-, proto bylo nutné připravovat reakce ve větších množstvích, aby byl připraven dostatek pro biologické testování. Některé deriváty se substitucí v poloze 9- se ale i tak nepodařilo připravit, převážně z důvodů obtížného čištění, ale také velmi špatné rozpustnosti v různých organických rozpouštědlech i vodě, což zabránilo i jednoznačné identifikaci pomocí NMR. Celkem bylo připraveno 12 látek a 9 z nich se dalo testovat.

Látky, které vyšly z biologického hodnocení jako látky s cytotoxickými vlastnostmi, jsou molekuly **30** a **34**. Jejich struktury jsou si velmi podobné, v poloze 7- mají navázaný velký tricyklický heteroaromatický substituent, který se liší jenom izosterní záměnou kyslíku za síru. Nemůžu zatím přesně říci, jak tyto látky působí. Je možné, že působí na PI3K, protože žádný popsaný PI3K nemá tak velkou aromatickou strukturu, i když je to méně pravděpodobné. Zajímavé je, že takto působí pouze látky se substitucí v poloze 7-, a ne v poloze 9-. Tyto látky budou podrobeny dalším testům, aby se zjistilo, čím je tato vlastnost způsobena.

V další fázi byly připravené látky testovány v kombinaci s cytostatikem doxorubicinem. Doxorubicin, jako interkalační látka, způsobuje DSB, tudíž by inhibice DNA-PK nebo jiných komponent opravných drah měla vést k vyšší účinnosti tohoto cytostatika. Při testech na chemosensibilizaci vyšla látka **33** ze všech testovaných látek nejlépe. Nejcitlivější nádorové linie byly HeLa, AGS, A549, nižší účinek byl pozorován u leukemických buněk Jurkat a buněk karcinomu vaječníků A2780. Buňky plicních fibroblastů MRC-5 nebyly naším inhibitorem téměř vůbec ovlivněny, což je pozitivní, protože látka **33** působí pravděpodobně jenom na nádorové, a ne na zdravé buňky. Nemůžu však s jistotou říct, že tato látka působí jako inhibitor DNA-PK. Mám jenom data z chemosenzibilizace, která sice napovídají, že by to tak mohlo být, ale může inhibovat více cílů, a proto bude tato látka dále testována. Pokud bude při poškození DNA docházet k fosforylacím Chk1 a Chk2, bude to znamenat, že ATM a ATR nejsou

inhibovány. Látka 33 bude dále podrobena testům ke zjištění hodnot  $IC_{50}$  vůči DNA-PK i PI3K, bude testována v kombinaci s radiací a jinými cytotoxickými látkami.

Substituent dibenzothiofen v molekulách **34** a **35** je srovnatelný se substitucí u NU7441, nicméně v poloze 9- vyšel z biologického testování jako neúčinný a v poloze 7- byl navíc cytotoxický. Mohlo by to znamenat, že díky jinému centrálnímu cyklu je posunuta geometrie nepolárního substituentu a tím pádem už nezapadá do aktivního místa, kde možná zapadá derivát pouze s malým substituentem thiofenem v poloze 9- (**33**). Jedná se o derivát s nejmenším substituentem, který byl připraven, je možné, že přesně zapadá do aktivního místa. Látka **33** vyšla z biologického testování lépe než NU7026, nicméně s NU7441 se porovnávat nedá, protože při testování byla použita jiná koncentrace.

Bylo by proto vhodné připravit sérii obdobných látek vycházejících z molekuly **33**, které by toto tvrzení mohly potvrdit. Různě substituovat thiofen alkylovými zbytky, izosterní záměnou kyslíku nebo dusíku za síru by byly připraveny deriváty se substitucí furanem či pyrrolem v poloze 9-. Přínosné by možná bylo změnit jádro molekuly, např. za pteridin či pyrimido[4,5-*d*]pyrimidin.

Bezpečnost těchto látek bude muset být dále testována. Jedná se o látky, které vyřazují opravu DNA. V biologickém hodnocení byly nádorové i nenádorové buněčné linie těmto látkám vystaveny pouze po dobu 48 hodin, nelze proto jasně říci, že na nenádorové buňky nepůsobí. Vyřazení drah, které jsou nutné pro opravu DNA, se může projevit až při delším či opakovaném užívání těchto látek. Jedná se především o mutagenitu a teratogenitu.

Terapeutický potenciál uplatnit se v léčbě rakoviny tyto nové látky nicméně mají. Podávaly by se cyklicky s radio a chemoterapií, kde by dávka cytostatika byla nižší než při konvenční terapii, což s sebou přináší snížení rizika vzniku nežádoucích účinků.



## 4 ZÁVĚR

Bylo připraveno 12 potenciálních inhibitorů DNA-PK, z toho se biologického testování, kde se měřily antiproliferativní a chemosenzibilizační vlastnosti, zúčastnilo z důvodu špatné rozpustnosti 9 látek. Dvě z nich byly vyloučeny z chemosenzibilizačního testu pro zjištěnou cytotoxicitu. Látka **33** vykazovala velmi dobré výsledky, hlavně chemosenzibilizační efekt na nádorové linie HeLa, AGS a A549. Navíc neovlivňovala MRC-5, což značí, že nemá vliv na nenádorové linie. Protože z výsledků biologického hodnocení nelze jednoznačně určit, zda se jedná o inhibitor DNA-PK, bude tato látka dále testována.

## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Baba, A.I.; Câtoi, C. *Comparative Oncology* [online]. The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest 2007. ISBN: 978-073-27-1457-7. [cit. 2017-02-26].  
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9557/>
2. DeSantis, C.E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, **2014**, *64*, 252-271.
3. Torre, L.A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends: an update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2016**, *25*, 16-27.
4. International Agency for Research of Cancer. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* [online],[cit. 2017-04-15].  
Dostupné z [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
5. Verma, M. et al. Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2014**, *23*, 223-233.
6. Dusek, L. et al. Estimating cancer incidence, prevalence, and the number of cancer patients treated with antitumor therapy in 2015 and 2020: analysis of the Czech National Cancer Registry. *Klin. Onkol.*, **2015**, *28*, 30-43.
7. Dusek, L. et al. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin. Onkol.*, **2014**, *27*, 406-423.
8. Kye, S.Y. et al. Cancer risk factors in Korean news media: a content analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2015**, *16*, 731-736.
9. Zandonai, A.P.; Sonobe, H.M.; Sawada, N.O. The dietary risk factors for colorectal cancer related to meat consumption. *Rev. Esc. Enferm. USP.* [online], **2012**, *46*, 234-239.[cit. 2017-04-15].  
Dostupné z: [http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v46n1/en\\_v46n1a31.pdf](http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v46n1/en_v46n1a31.pdf)
10. Danaei, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, **2005**, *366*, 1784-1793.
11. Ryan, A.M. et al. Poor awareness of risk factors for cancer in Irish adults: results of a large survey and review of the literature. *Oncologist*, **2015**, *20*, 372-788.
12. Elkum, N. et al. Obesity is a significant risk factor for breast cancer in Arab women. *BMC Cancer* [online], **2014**, *14*:788. [cit. 2017-04-15].

Dostupné z: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-788>

13. Lagerlund, M. et al. Awareness of risk factors for cancer: a comparative study of Sweden and Denmark. *BMC Public Health*[online], **2015**, *15*:1156. [cit. 2017-04-15].  
Dostupné z: <https://bmcpublikealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-015-2512-9>
14. O'Malley, M. et al. Effects of cigarette smoking on metabolism and effectiveness of systemic therapy for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, **2014**, *9*, 917-926.
15. Roswall, N; Weiderpass, E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *J. Prev. Med. Public Health*, **2015**, *48*, 1-9.
16. McDonnell, D.P. et al. Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res.*, **2014**, *74*, 4976-4982.
17. Nelson, E.R.; C.Y. Chang, C.Y.; McDonnell, D.P. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2014**, *25*, 649-655.
18. Schairer, C. et al. Risk factors for inflammatory breast cancer and other invasive breast cancers. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **2013**, *105*, 1373-1384.
19. Valle, L. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J. Gastroenterol.*, **2014**, *20*, 9828-9849.
20. Ghiorzo, P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, **2014**, *20*, 10778-10789.
21. Benafif, S.; Eeles, R. Genetic predisposition to prostate cancer. *Br. Med. Bull.*, **2016**, *120*, 75-89.
22. Yu, H. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **2002**, *20*, 149-183.
23. Lawrence, S.H.; Selwood, T.; Jaffe, E. K. Environmental contaminants perturb fragile protein assemblies and inhibit normal protein function. *Curr. Chem. Biol.*, **2013**, *7*, 196-206.
24. Scheel, B.I.;Holtedahl, K. Symptoms, signs, and tests: the general practitioner's comprehensive approach towards a cancer diagnosis. *Scand. J. Prim. Health. Care*, **2015**, *33*, 170-177.
25. Bailey, J.R.; Aggarwal, A.; Imperiale, T.F. Colorectal cancer screening: stool DNA and other noninvasive modalities. *Gut Liver*, **2016**, *10*, 204-211.

26. Miller, J.W. et al. From cancer screening to treatment: service delivery and referral in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program. *Cancer*, **2014**, *120*, Suppl. 16, 2549-2556.
27. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**, *144*, 646-674.
28. Vicente-Duenas, C. et al. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBOJ.*, **2013**, *32*, 1502-1513.
29. Alberola-Ila, J.; Hernandez-Hoyos, G. The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol. Rev.*, **2003**, *191*, 79-96.
30. Ramjaun, A.R.; Downward, J. Ras and phosphoinositide 3-kinase: partners in development and tumorigenesis. *Cell Cycle*, **2007**, *6*, 2902-2905.
31. Robey, R.B.; Hay, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*, **2006**, *25*, 4683-4696.
32. Yang, Y.A. et al. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp. Cell Res.*, **2002**, *279*, 80-90.
33. Gustin, J.P.; Cosgrove, D.P.; Park, B.H. The PIK3CA gene as a mutated target for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2008**, *8*, 733-740.
34. Lothe R.A.; Blomhoff, H.K. Tumor suppressors: genes and proteins. *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, **1998**, *118*, 1887-1892.
35. Liu, J. et al. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.*, **2015**, *356* (2 Pt A), 197-203.
36. Chu, E.C.; Tarnawski, A.S. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med. Sci. Monit.*, **2004**, *10*, RA235-241.
37. Gillies, R.J.; Gatenby, R.A. Metabolism and its sequelae in cancer evolution and therapy. *Cancer J.*, **2015**, *21*, 88-96.
38. Benjamin, D.I.; Cravatt, B.F.; Nomura, D.K. Global profiling strategies for mapping dysregulated metabolic pathways in cancer. *Cell Metab.*, **2012**, *16*, 565-577.
39. Munoz-Pinedo, C.; El Mjiyad, N.; Ricci, J.E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* [online], **2012**, *3*:e248 [cit. 2017-04-15].  
Dostupné z: <http://www.nature.com/cddis/journal/v3/n1/full/cddis2011123a.html>

40. Gatenby, R.A.; Gillies, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 891-899.
41. Gillies, R.J.; Verduzco, D; Gatenby, R.A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, *12*, 487-493.
42. Fritz, V.; Fajas, L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*, **2010**, *29*, 4369-4377.
43. Choi, S.Y. et al. Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite? *J. Pathol.*, **2013**, *230*, 350-355.
44. David, C.J. et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, **2010**, *463*, 364-368.
45. Christofk, H.R. et al. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*, **2008**, *452*, 181-186.
46. Sun, Q. et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2011**, *108*, 4129-4134.
47. Wu, H.-C.; Chang, D.-K.; Huang, C.-T. Targeted therapy for cancer. *J. Cancer. Mol.*, **2006**, *2*, 57-66.
48. Ritter, J.M.; Lewis, L.D.; Mant, T.G.K; Ferro, A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 5<sup>th</sup> ed. Hodder Arnold, London 2008. ISBN 978-0-340-90046-8.
49. Tao, J.J.; Visvanathan, K.; Wolff, A.C. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast*, **2015**, *24* Suppl 2, S149-S153.
50. Attarwala, H. Role of antibodies in cancer targeting. *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, **2010**, *1*, 53-56.
51. Afghahi, A.; Sledge, G.W., Jr. Targeted therapy for cancer in the genomic era. *Cancer J.*, **2015**, *21*, 294-298.
52. Druker, B.J. et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *344*, 1031-1037.
53. Arjunan, K.P.; Sharma, V.K.; Ptasinska, S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 2971-3016.
54. Jackson, S.P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **2009**, *461*, 1071-1078.

55. Zhou, B.B.; Bartek,J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat. Rev.Cancer*, **2004**, *4*, 216-225.
56. Hosoya, N.; Miyagawa, V. Targeting DNA damage response in cancer therapy.*Cancer Sci.*, **2014**, *105*, 370-388.
57. Nijman, S.M.B. Synthetic lethality: General principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett.*, **2011**, *585*, 1-6.
58. Goulooze, S.C.; Cohen, A.F.; Rissmann,R. Olaparib. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2016**, *81*, 171-173.
59. Lempiäinen, H.; Halazonetis,T.D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J.*, **2009**, *28*, 3067-3073.
60. Lavin, M.F.; Shiloh, Y. Ataxia-telangiectasia: a multifaceted genetic disorder associated with defective signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.*, **1996**, *8*, 459-464.
61. Shiloh, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 155-168.
62. Walker, J.R.; Corpina, R.A.; Goldberg,J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **2001**, *412*, 607-614.
63. Dobbs, T.A.; Tainer, J.A.; Lees-Miller, S.P. A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst.)*, **2010**, *9*, 1307-1314.
64. Andrs, M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: importance of the morpholine ring. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 41-71.
65. Shrivastav, M.; De HaroL.P.; Nickoloff,J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, **2008**, *18*, 134-147.
66. Shrivastav, M. et al.DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst.)*, **2009**, *8*, 920-929.
67. Powis, G. et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 2419-2423.
68. Sarkaria, J.N. et al. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 4375-4382.

69. Vlahos, C.J. et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 5241-5248.
70. Hollick, J.J. et al. 2,6-disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 3083-3086.
71. Griffin, R.J. et al. Selective benzopyranone and pyrimido[2,1-*a*]isoquinolin-4-one inhibitors of DNA-dependent protein kinase: synthesis, structure-activity studies, and radiosensitization of a human tumor cell line in vitro. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 569-585.
72. Hardcastle, I.R. et al. Discovery of potent chromen-4-one inhibitors of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) using a small-molecule library approach. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7829-7846.
73. Nutley, B.P. et al. Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-PK inhibitor NU7026. *Br. J. Cancer*, **2005**, *93*, 1011-1018.
74. Leahy, J.J. et al. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 6083-6087.
75. Zhao, Y. et al. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 5354-5362.
76. Barbeau, O.R. et al. Quinolinone and pyridopyrimidinone inhibitors of DNA-dependent protein kinase. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2670-2677.
77. Cano, C. et al. 1-substituted (dibenzo[*b,d*]thiophen-4-yl)-2-morpholino-4*H*-chromen-4-ones endowed with dual DNA-PK/PI3-K inhibitory activity. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 6386-6401.
78. Pritchard, K.M.; Al-Rawi, J.; Bradley, C. Synthesis, identification and antiplatelet evaluation of 2-morpholino substituted benzoxazines. *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, *42*, 1200-1210.
79. Ihmaid, S.K. et al. Synthesis, DNA-PK inhibition, anti-platelet activity studies of 2-(*N*-substituted-3-aminopyridine)-substituted-1,3-benzoxazines and DNA-PK and PI3K inhibition, homology modelling studies of 2-morpholino-(7,8-di and 8-substituted)-1,3-benzoxazines. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *57*, 85-101.
80. Durant, S; Karran, P. Vanillins: a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5501-5512.

81. Hickson, I. et al. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 9152-9159.
82. Golding, S.E. et al. Improved ATM kinase inhibitor KU-60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, *8*, 2894-2902.
83. Foote, K.M. et al. Discovery of 4-{4-[(3*R*)-3-methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1*H*-indole (AZ20): a potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 2125-2138.
84. Vendetti, F.P. et al. The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo. *Oncotarget*, **2015**, *6*, 44289-44305.
85. Bakkestuen, A.K.; Gundersen, L.-L. Regioselective *N*-9 arylation of purines employing arylboronic acids in the presence of Cu (II). *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 3359-3362.
86. Ding, S. et al. Expanding the diversity of purine libraries. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 8751-8755.
87. Elliott, E.C. et al. Convenient syntheses of halo-dibenz[*b,f*]azepines and carbamazepine analogues via *N*-arylindoles. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 8426-8434.
88. Guo, X. et al. An inexpensive and efficient copper catalyst for *N*-arylation of amines, amides and nitrogen-containing heterocycles. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 2197-2202.
89. Hosseinzadeh, R.; Tajbakhsh, M.; Alikarami, M. Copper-catalyzed *N*-arylation of diazoles with aryl bromides using KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: an improved protocol. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 5203-5205.
90. Qiao, J.X.; Lam, P.Y. Copper-promoted carbon-heteroatom bond cross-coupling with boronic acids and derivatives. *Synthesis*, **2011**, 829-856.
91. Wang, X.; Jang, H.-Y. All-purpose copper catalyst for coupling of ammonium salts and 1° and 2° amines with boronic acid. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2012**, *33*, 1785-1787.
92. Wentzel, M.T. et al. Copper-catalyzed *N*-arylation of hindered substrates under mild conditions. *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, *351*, 931-937.



## PŘÍLOHY

**Příloha 1.** Životaschopnost buněk po použití samotných inhibitorů.

	28	29	30	31	32	33	34
<b>Jurkat</b>	93 ± 9	90 ± 7	4 ± 0	94 ± 6	95 ± 7	96 ± 14	11 ± 1
<b>A2780</b>	105 ± 9	99 ± 9	26 ± 2	97 ± 2	98 ± 3	88 ± 7	33 ± 6
<b>A549</b>	105 ± 20	111 ± 19	29 ± 2	107 ± 4	114 ± 14	108 ± 8	83 ± 1
<b>HT-29</b>	121 ± 15	101 ± 6	61 ± 11	100 ± 2	119 ± 23	102 ± 9	66 ± 5
<b>AGS</b>	98 ± 2	93 ± 7	28 ± 4	103 ± 2	98 ± 2	84 ± 3	35 ± 7
<b>HeLa</b>	103 ± 2	97 ± 6	12 ± 2	95 ± 8	99 ± 12	103 ± 8	23 ± 6
<b>SAOS-2</b>	99 ± 8	101 ± 7	30 ± 3	102 ± 6	106 ± 5	97 ± 1	57 ± 9
<b>PANC-1</b>	89 ± 6	93 ± 6	48 ± 3	94 ± 9	100 ± 7	104 ± 6	73 ± 5
<b>MCF-7</b>	105 ± 2	114 ± 3	63 ± 1	118 ± 13	101 ± 9	103 ± 8	65 ± 6
<b>MRC-5</b>	99 ± 5	97 ± 3	24 ± 3	103 ± 2	105 ± 2	104 ± 4	61 ± 2

	35	36	NU7441	NU7026	KU-5933	DOX
<b>Jurkat</b>	93 ± 8	89 ± 8	99 ± 2	86 ± 7	77 ± 6	2 ± 1
<b>A2780</b>	105 ± 5	96 ± 9	94 ± 7	77 ± 4	94 ± 3	3 ± 1
<b>A549</b>	105 ± 6	100 ± 2	103 ± 8	79 ± 16	98 ± 8	62 ± 16
<b>HT-29</b>	92 ± 2	84 ± 9	104 ± 5	93 ± 16	99 ± 4	58 ± 9
<b>AGS</b>	108 ± 11	98 ± 5	92 ± 2	88 ± 4	95 ± 12	7 ± 6
<b>HeLa</b>	100 ± 1	89 ± 1	105 ± 5	95 ± 10	106 ± 5	12 ± 6
<b>SAOS-2</b>	99 ± 3	88 ± 4	97 ± 3	93 ± 6	98 ± 2	17 ± 1
<b>PANC-1</b>	103 ± 3	86 ± 4	103 ± 5	103 ± 5	114 ± 11	72 ± 9
<b>MCF-7</b>	101 ± 6	89 ± 2	96 ± 6	78 ± 3	106 ± 3	44 ± 3
<b>MRC-5</b>	106 ± 2	96 ± 10	101 ± 5	94 ± 7	103 ± 5	30 ± 5

0 - 25

26 - 50

51 - 75

Hodnoty představují životaschopnost buněk po působení inhibitorů a jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti neošetřených kontrolních buněk (100 %). Každá hodnota je průměrem z 3 nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD).

Hodnoty z intervalu 0 – 25 %, 16 – 50 % a 51 – 75 % jsou zvýrazněny barevně.

**Příloha 2.**Chemosenzibilizační vlastnosti inhibitorů a standardů.

<b>INH</b>	<b>control</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>32</b>
<b>Jurkat</b>	100	93 ± 9	90 ± 7	94 ± 6	95 ± 7
<b>A2780</b>	100	105 ± 9	99 ± 9	97 ± 2	98 ± 3
<b>A549</b>	100	105 ± 20	111 ± 19	107 ± 4	114 ± 14
<b>HT-29</b>	100	121 ± 15	101 ± 6	100 ± 2	119 ± 23
<b>AGS</b>	100	98 ± 2	93 ± 7	103 ± 2	98 ± 2
<b>HeLa</b>	100	103 ± 2	97 ± 6	95 ± 8	99 ± 12
<b>SAOS-2</b>	100	99 ± 8	101 ± 7	102 ± 6	106 ± 5
<b>PANC-1</b>	100	89 ± 6	93 ± 6	94 ± 9	100 ± 7
<b>MCF-7</b>	100	105 ± 2	114 ± 3	118 ± 13	101 ± 9
<b>MRC-5</b>	100	99 ± 5	97 ± 3	103 ± 2	105 ± 2

<b>INH</b>	<b>33</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>NU7441</b>	<b>NU7026</b>	<b>KU55933</b>
<b>Jurkat</b>	96 ± 14	93 ± 8	89 ± 8	99 ± 2	86 ± 7	77 ± 6
<b>A2780</b>	88 ± 7	105 ± 5	96 ± 9	94 ± 7	77 ± 4	94 ± 3
<b>A549</b>	108 ± 8	105 ± 6	100 ± 2	103 ± 8	79 ± 16	98 ± 8
<b>HT-29</b>	102 ± 9	92 ± 2	84 ± 9	104 ± 5	93 ± 16	99 ± 4
<b>AGS</b>	84 ± 3	108 ± 11	98 ± 5	92 ± 2	88 ± 4	95 ± 12
<b>HeLa</b>	103 ± 8	100 ± 1	89 ± 1	105 ± 5	95 ± 10	106 ± 5
<b>SAOS-2</b>	97 ± 1	99 ± 3	88 ± 4	97 ± 3	93 ± 6	98 ± 2
<b>PANC-1</b>	104 ± 6	103 ± 3	86 ± 4	103 ± 5	103 ± 5	114 ± 11
<b>MCF-7</b>	103 ± 8	101 ± 6	89 ± 2	96 ± 6	78 ± 3	106 ± 3
<b>MRC-5</b>	104 ± 4	106 ± 2	96 ± 10	101 ± 5	94 ± 7	103 ± 5

<b>INH+DOX</b>	<b>control</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>
<b>Jurkat</b>	100	64 ± 16	62 ± 9	71 ± 7	64 ± 16	61 ± 3
<b>A2780</b>	100	47 ± 7	43 ± 6	44 ± 5	45 ± 5	43 ± 8
<b>A549</b>	100	99 ± 10	87 ± 15	98 ± 14	86 ± 12	12 ± 7
<b>HT-29</b>	100	64 ± 9	59 ± 14	58 ± 13	41 ± 19	20 ± 12
<b>AGS</b>	100	64 ± 9	58 ± 4	66 ± 4	48 ± 12	10 ± 6
<b>HeLa</b>	100	65 ± 7	62 ± 5	65 ± 5	57 ± 13	7 ± 10
<b>SAOS-2</b>	100	65 ± 13	65 ± 12	69 ± 14	61 ± 6	25 ± 5
<b>PANC-1</b>	100	58 ± 3	53 ± 2	55 ± 3	45 ± 7	29 ± 0
<b>MCF-7</b>	100	50 ± 11	50 ± 7	37 ± 8	17 ± 11	14 ± 3
<b>MRC-5</b>	100	69 ± 5	76 ± 9	82 ± 6	81 ± 9	71 ± 3

<b>INH+DOX</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>NU7441</b>	<b>NU7026</b>	<b>KU55933</b>	<b>DOX</b>
<b>Jurkat</b>	69 ± 6	72 ± 1	69 ± 1	70 ± 11	58 ± 3	78 ± 3
<b>A2780</b>	56 ± 7	52 ± 5	55 ± 8	44 ± 4	65 ± 8	55 ± 4
<b>A549</b>	83 ± 9	74 ± 3	81 ± 4	58 ± 8	75 ± 5	93 ± 5
<b>HT-29</b>	49 ± 6	47 ± 7	64 ± 9	66 ± 9	63 ± 23	54 ± 14
<b>AGS</b>	64 ± 10	62 ± 16	82 ± 23	57 ± 14	85 ± 17	76 ± 14
<b>HeLa</b>	68 ± 7	57 ± 5	83 ± 18	63 ± 7	59 ± 7	72 ± 9
<b>SAOS-2</b>	71 ± 10	62 ± 6	80 ± 11	58 ± 10	56 ± 17	75 ± 9
<b>PANC-1</b>	58 ± 1	52 ± 4	63 ± 4	43 ± 1	37 ± 3	58 ± 0
<b>MCF-7</b>	40 ± 9	39 ± 8	48 ± 12	26 ± 7	37 ± 11	43 ± 7
<b>MRC-5</b>	86 ± 3	78 ± 5	79 ± 19	70 ± 4	68 ± 10	79 ± 7

0 - 25
26 - 50
51 - 75

Hodnoty představují životaschopnost buněk po působení inhibitorů a jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti neošetřených kontrolních buněk (100 %). Každá hodnota je průměrem ze 3 nezávislých měření ± směrodatná odchylka (SD).

Hodnoty z intervalu 0 – 25 %, 26 – 50 % a 51 – 75 % jsou zvýrazněny barevně.