

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Syntéza a biologické hodnocení purinových inhibitorů  
fosfatidylinositol-3-kinas a příbuzných proteinkinas I.**

Diplomová práce

Michaela Poledníková

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

Konzultant: Mgr. Martin Andrš

Hradec Králové 2017

## 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,

.....

Michaela Poledníková

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. a Mgr. Martinu Andršovi za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Dále děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D., prof. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. a Mgr. Martině Seifrtové, Ph.D. za pomoc při analytickém a biologickém hodnocení.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Michaela Poledníková

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

Konzultant: Mgr. Martin Andrš

Název diplomové práce: Syntéza a biologické hodnocení purinových inhibitorů fosfatidylinositol-3-kinas a příbuzných proteinkinas I.

Rakovina je skupina onemocnění charakterizována nekontrolovaným a abnormálním růstem buněk. Protinádorová chemoterapie je jedna ze základních metod léčby, ale mechanismus účinku je nespecifický a zasahuje všechny rychle se dělící buňky, ať už buňky nádorové, tak i normální tkáně. Jedním a v poslední době velmi studovaným způsobem, jak vylepšit stávající terapii, je inhibice reparačních mechanismů DNA. To by potenciálně vedlo k vyšší účinnosti cytotoxické terapie i ke snížení potřebných dávek cytostatik, což by se projevilo snížením nežádoucích účinků. Vhodný kandidát pro tento účel je rodina fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzných kinas (PIKK).

V rámci této diplomové práce bylo připraveno šestnáct purinových analog neselektivního inhibitoru PIKK, LY29402. Byl stanoven chemosenzibilizující účinek těchto nově syntetizovaných inhibitorů v kombinaci s doxorubicinem na 9 nádorových a 1 nenádorové buněčné linii. Dva z připravených inhibitorů vykazovaly chemosenzibilizující účinek na většině nádorových buněčných liniích a mohou mít tedy terapeutický potenciál pro léčbu pacientů s rakovinou.

## **ABSTRACT**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Michaela Poledníková

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 I.

Cancer is a group of diseases characterized by the uncontrolled, abnormal growth of cells. Anticancer chemotherapy is one of the basic methods for treatment, but its mechanism of action is not specific and targets rapidly dividing cells, including cancer cells as well as certain normal tissues. In recent years one of the most studied ways to improve cancer treatment is inhibition of DNA repair mechanisms. This process can lead to potentially higher efficacy of cytotoxic therapy and thus lower doses of cytostatic agents with benefit of less adverse side effects for the patient. Suitable candidate for this purpose is family of phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases (PIKK).

In this diploma thesis, sixteen purine analogs of nonselective inhibitor PIKK LY294002 were prepared. We also analyzed chemo-sensitizing properties of these newly synthesized inhibitors in combination with a chemotherapeutic agent doxorubicin in 9 human cancerous and 1 non-cancerous cell lines. Two inhibitors have chemo-sensitizing effect on most cancer cell lines and may have therapeutic potential for the treatment of patient with cancer.

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
ÚVOD .....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1.1 RAKOVINA .....	11
1.1.1 CHARAKTERIZACE RAKOVINY .....	11
1.1.2 ROZDĚLENÍ NÁDORŮ .....	11
1.1.3 PREVALENCE.....	12
1.1.4 RIZIKOVÉ FAKTORY .....	13
1.1.5 PREVENCE .....	13
1.1.6 VZNIK NÁDORU .....	14
1.1.7 CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK .....	15
1.2 TERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	16
1.2.1 HISTORIE A VÝVOJ.....	16
1.2.2 KLASICKÁ CYTOSTATIKA.....	17
1.2.3 CÍLENÁ LÉČBA.....	21
1.2.4 CHEMOIMUNOTERAPIE .....	25
1.2.5 REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK K LÉČBĚ .....	25
1.3 DNA DAMAGE RESPONSE – ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA .....	26
1.3.1 POŠKOZENÍ DNA .....	26
1.3.2 FOSFATIDYLINOSITOL-3-KINASAM PŘÍBUZNÉ PROTEIN KINASY A OPRAVA DVOUŘETĚZCOVÝCH ZLOMŮ .....	27
1.3.3 VYUŽITÍ OPRAV DNA V LÉČBĚ .....	29
1.3.4 INHIBITORY ATM, ATR a DNA-PK.....	30
2 PRAKTICKÁ ČÁST.....	34
2.1 SYNTETICKÁ ČÁST .....	34
2.1.1 OBECNÁ SYNTETICKÁ ČÁST .....	34
2.1.2 OBECNÉ SCHÉMA SYNTÉZY .....	35
2.1.3 SYNTÉZA 9-BENZYL-2,6-DICHLOR-9 <i>H</i> -PURINU (1), 7-BENZYL-2,6- DICHLOR-7 <i>H</i> -PURINU (9) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (2-8 A 10-16) ...	36
2.1.4 SYNTÉZA 9-BENZYL-2-CHLOR-1,9-DIHYDRO-6 <i>H</i> -PURIN-6-ONU (17) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (18-24 A 25-32) .....	40
2.1.5 POSTUP PRO PŘÍPRAVU 9-BENZYL-2-MORFOLINO-1,9-DIHYDRO-6 <i>H</i> - PURIN-6-ON (33) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (34-40 A 41-48) .....	44
2.2 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ.....	49
2.2.1 PRŮBĚH A CÍL TESTOVÁNÍ .....	49
2.2.2 MATERIÁLY A METODY .....	49

2.2.3 VÝSLEDKY .....	50
2.2.3.1 ANTIPROLIFERATIVNÍ PŮSOBNÍ .....	50
2.2.3.2 CHEMOSENSIBILIZACE .....	51
3 DISKUZE.....	54
4 ZÁVĚR .....	56
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
6 PŘÍLOHY .....	63

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia a Rad3 related
BCR-ABL	breakpoint cluster region – Abelson tyrosine kinase protein
BRCA 1 a 2	breast cancer 1 a 2
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CML	chronická myeloidní leukémie
DDR	DNA damage response
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA dependentní proteinkinasa
DOX	doxorubicin
DSBs	double-strand breaks, dvouřetězcové zlomy
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPR efekt	enhanced permeability and retention
ErbB	erythroblastosis receptor B
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	fibroblast growth factor receptor
HPV	lidský papilomavirus
HR	homologní rekombinance
hSMG-1	human suppressor of morphogenesis in genitalia 1
HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu
Chk1 a 2	checkpoint kinasy 1 a 2
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IL-2	interleukin 2



mTOR	mammalian target of rapamycin
NHEJ	nehomologní spojování konců
nRTK	nereceptorové tyrosinkinasy
PARP	poly (ADP-ribosa) polymerasa
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIKK	fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzné kinasy
RTK	receptorové tyrosinkinasy
SSBs	single-strand breaks, jednořetězcové zlomy
TMS	tetramethylsilan
TRRAP	transformation/transcription associated protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	Světová zdravotnická organizace

## ÚVOD

Rakovina je velkou hrozbou současného světa, neboť se společně s kardiovaskulárními chorobami řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí. Světová zdravotnická organizace (WHO) navíc předpokládá, že počet nově diagnostikovaných pacientů se bude nadále zvyšovat.

Obecně lze říci, že k nádorovému bujení může dojít u každého typu buněk. Ty se postupně začínou vymykat kontrole, napadnou okolní tkáň a působí na tělo škodlivě. Léčba tohoto onemocnění je velmi komplikovaná, ale v současné době již dokážeme úspěšně léčit velké množství nádorů. Bohužel univerzální lék na všechny typy rakoviny zatím neexistuje, a proto řada vědců soustředí svůj výzkum na léčbu tohoto zákeřného onemocnění. Každý rok se objeví mnoho nových poznatků, které by v budoucnu mohly hrát důležitou roli v terapii.

Pokud má pacient se zhoubným nádorem šanci na vyléčení, tak se lékaři spoléhají primárně na širokospektrý konzervativní typ léčby spočívající v kombinaci chemoterapie a radioterapie. Dochází také k velkému rozvoji cílené léčby zasahující nádorové buňky bez současného poškození zdravé tkáně. Velkým negativem je však vysoká cena, proto se cílená léčba zatím používá u pacientů, u nichž konvenční terapie nepřináší dobré terapeutické výsledky, nebo ji z nějakého důvodu mít nemohou.

Velká pozornost je také věnována výzkumu oprav DNA. V důsledku léčby ionizujícím zářením či cytostatiky je DNA vystavena genotoxickému stresu a následnému poškození. Inhibicí reparačních mechanismů nádorových buněk může dojít ke zvýšení účinnosti léčby, postačí tedy nižší dávky záření nebo léčiv a v neposlední řadě se sníží četnost nežádoucích účinků pro lidský organismus. V této práci se věnuji vývoji nových látek, které ovlivňují DNA reparační mechanismy inhibicí fosfatidylinositol-3-kinasam příbuzných kinas, které hrají při opravách DNA nezastupitelnou roli.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 RAKOVINA

### 1.1.1 CHARAKTERIZACE RAKOVINY

Rakovina je skupina onemocnění, kterou můžeme charakterizovat jako nekontrolovatelný růst a šíření abnormální buněk. Přeměna normálních buněk v nádorové je vícestupňová a vzniká na podkladě mutací a změn DNA. Lidská DNA je denně vystavena různým exogenním a endogenním genotoxickým vlivům, které ji mohou poškodit. Poškození DNA a související opravné mechanismy poté hrají zásadní roli v procesu kancerogeneze. Při neefektivní opravě DNA získávají buňky v důsledku mutací, amplifikací, delecí a epigenetických modifikací schopnost neomezené replikace, ochrany před imunitním systémem a mohou přecházet do maligní formy.<sup>1,2</sup>

### 1.1.2 ROZDĚLENÍ NÁDORŮ

Nádory můžeme rozdělit dle biologických vlastností na benigní, intermediární a maligní. Benigní nádory se vyznačují pomalým a expanzivním růstem, kdy nabývají na objemu a postupně utlačují okolní buňky. Bývají často ohraničené, či opouzdřené a tím jsou většinou snadno operovatelné. Při úspěšném odstranění se neopakují a netvoří metastázy. Intermediární nádory jsou na pomezí mezi benigními a maligními tumory. Obecně mají lepší prognózu než agresivní maligní tumory, občas však dochází k recidivám a v některých případech mohou i metastazovat. Opakem benigních nádorů jsou nádory maligní, které invazivně až destruktivně napadají zdravou tkáň a vyznačují se neohraničenou strukturou a rychlým růstem.<sup>2,3</sup> Nejzávažnějším znakem malignity je tvorba metastáz. Metastázy se vyskytují v pokročilých stádiích nádorových onemocnění, když nádorové buňky vniknou do některé z možných cest šíření (krevní nebo lymfatické cévy, tělní dutiny), odolají protinádorové imunitě a zachytí se ve vzdáleném místě, kde se množí a rostou. Výsledkem je závažné poškození tkáně a komplikovanější léčba.<sup>4</sup>

Solidní nádory (z latinského *solidus* čili pevný) tvoří 95 % všech nádorů. Rostou jako pevná a měřitelná ložiska odlišitelná od zdravé tkáně. Jsou viditelná pomocí zobrazovacích metod nebo i pouhým okem. Vlastní nádor tvoří jen nádorové buňky, ale nalezneme zde příměs vaziva, zbytky krevních cév a bílé krvinky, které

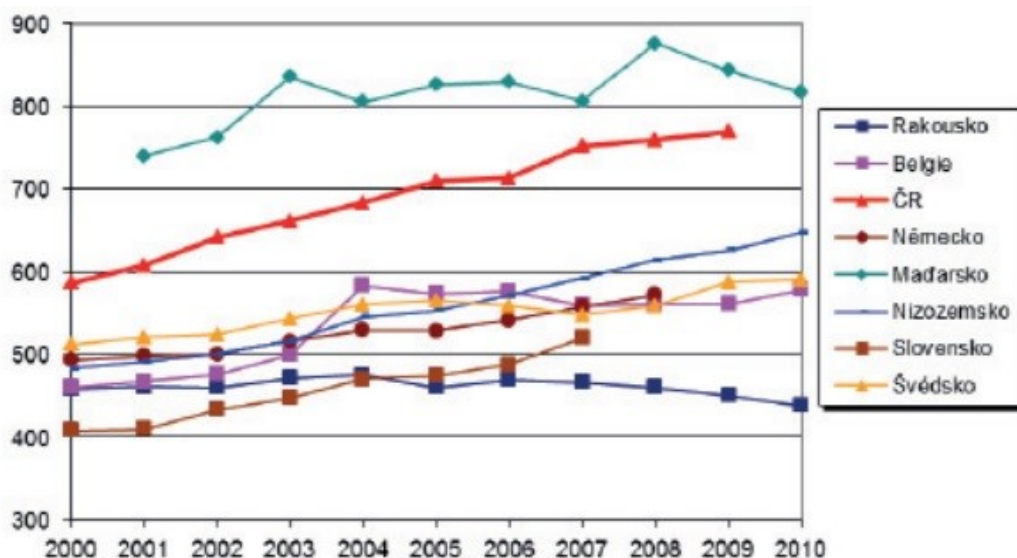
zde reagují na nový typ tkáně. Opakem jsou hematologické nádory představující zbylých 5 %. Tyto nádory solidní ložiska nevytvářejí, jejich buňky jsou již od počátku součástí krve a cestují krevním oběhem po celém organismu. Typickým příkladem „tekutého nádoru“ je leukémie.<sup>5</sup>

Dle původu a histologického vzhledu dělíme nádory na epitelové, mezenchymové, z nervové tkáně, smíšené, teratomy a nádory trofoblastu.<sup>3</sup>

### **1.1.3 PREVALENCE**

Zhoubná nádorová onemocnění se řadí k celosvětovým problémům. V současnosti rakovina tvoří asi jedno z každých sedmi úmrtí na celém světě – více než HIV/AIDS, tuberkulóza a malárie dohromady. V roce 2012 bylo diagnostikováno přibližně 14,1 milionů případů rakoviny, přičemž 8,2 milionů nemocných této chorobě podlehl. Rakovina tedy představuje obrovskou globální zátěž, dotýká se každé oblasti a socioekonomické skupiny a díky růstu a stárnutí populace se dá předpokládat další růst těchto čísel.<sup>6</sup>

Česká republika patří společně s Maďarskem k evropským zemím s nejvyšší incidencí zhoubných novotvarů, přičemž stále dochází k pozvolnému zvyšování počtu nově diagnostikovaných pacientů (Obr. 1). Je to důsledkem stárnutí populace, vystavení kancerogenům v životním prostředí, ale také zlepšující se diagnostikou, díky které jsme schopni rakovinu odhalit i v raných stádiích. Úmrtnost naopak v posledních několika letech mírně klesá. Důvodem je kvalitní léčba a zavedení plošného onkologického screeningu, kdy včasným záchytem zvýšíme pravděpodobnost úspěchu léčby.<sup>7</sup>



**Obrázek 1.** Incidence nádorových onemocnění v letech 2000-2010 ve vybraných státech EU (počet onemocnění na 100 000 obyvatel). Převzato z citace<sup>7</sup>

#### 1.1.4 RIZIKOVÉ FAKTORY

Příčina pro mnoho druhů rakoviny zůstává stále neznámá. Ke vzniku rakoviny přispívá několik vnějších a vnitřních faktorů. Vnější faktory zahrnují infekční organismy, pesticidy, toxiny životního prostředí, tabák, nezdravou stravu a s tím související nadbytečnou tělesnou hmotnost. Z vnitřních neovlivnitelných faktorů jsou to potom dědičné genetické mutace, hormonální změny, celkový stav imunitního systému a věk daného jedince. Tyto rizikové faktory mohou působit současně nebo jednotlivě na vzniku a progresi rakoviny. Často uběhne deset a více let od první expozice po detekovatelné nádorové změny.<sup>2,8,9</sup>

#### 1.1.5 PREVENCE

Rakovina je nemoc často nepředvídatelná a může se projevit u kohokoliv v jakémkoliv věku. Riziko některých typů rakoviny se ale dá snížit úpravou životního stylu. Vzniku rakoviny z nadměrné konzumace alkoholu či užívání tabáku by se mohlo zabránit úplně a rakovině spojené s infekcí, např. lidský papilomavirus (HPV), lze předcházet změnou chování nebo očkováním. V neposlední řadě hraje důležitou roli screening. Screeningová vyšetření ve zdravých i rizikových populacích nabízí možnost odhalit rakovinu včas a tím zvýšit naději na úspěšnou léčbu. V současné době existuje několik typů rakovin, které mají svůj screeningový test. Bohužel pro mnoho druhů nádorových onemocnění tato možnost stále chybí.<sup>6,8</sup>

Screening definujeme jako použití testu mezi jedinci s vyšší pravděpodobností výskytu rakoviny za účelem včasné diagnostiky (sekundární prevence) nebo prevence komplikací (terciární prevence). Hlavními kritérii pro doporučení na screeningová vyšetření jsou věk, pohlaví a pozitivní rodinná anamnéza. Screeningová vyšetření jsou ovšem náchylná ke zkreslení a hrozí zde detekce nálezu, který by v průběhu života pacienta nevyžadoval lékařský zákrok.<sup>10</sup>

V České republice nyní běží 3 screeningové programy – screening kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a karcinomu děložního čípku. Populační screening kolorektálního karcinomu byl zahájen v roce 2000 a spočívá v absolvování testu na okultní krvácení do stolice každé 2 roky při věku nad 55 let, nebo v podstoupení kolonoskopie jednou za 10 let.<sup>11</sup> Screening karcinomu děložního hrdla zahrnuje sčítání z děložního čípku a následný rozbor v akreditované laboratoři. Tento screening se provádí každoročně v rámci preventivní prohlídky. Každá žena od 45 let má také nárok na preventivní mamografické vyšetření jednou za 2 roky. U nosiček mutací genů breast cancer 1 a 2 (BRCA1, BRCA2) by měla být mamografie prováděna každý rok při věku nad 30 let.<sup>12</sup>

Bohužel i přes částečnou možnost prevence se dá v roce 2017 předpokládat okolo 1,7 milionů nově diagnostikovaných pacientů jen ve Spojených státech amerických a přes 600 000 Američanů v tomtéž roce rakovině podlehnou.<sup>8</sup>

### **1.1.6 VZNIK NÁDORU**

Existuje mnoho definic nádoru. Dle jedné z mnoha se jedná o prakticky nezvratnou změnu tkáně, kdy je ireverzibilita tohoto děje míněna tak, že se jednou vzniklý nádor již nemůže přeměnit v normální tkáň lidského organismu, i když nádorové buňky vycházejí z vlastních buněk lidského těla. Hlavní podstatou pro vznik nádoru je narušení kontrolních mechanismů, které jsou odpovědné za růst normálních tkání.<sup>3</sup>

Ve zdravých buňkách je růst, dělení a smrt buněk řízena složitou soustavou vzájemně vyvážených aktivátorů a represorů. Pokud buňka dostává signál k růstu, převáží aktivátory růstu nad represory. Pokud má být buňka v klidu, represory potlačí aktivitu růstových signálních drah a růst buňky se zastaví. To samé platí i pro signální dráhy apoptózy. Při poruše kontrolních mechanismů, kdy signály pro růst buněk převáží nad represory, se buňka začne nekontrolovatelně dělit. Pokud

dojde zároveň k poruchám apoptózy, takto poškozené buňky navíc přestanou umírat a nádor se začne rychle šířit. Změny v buňce, které způsobí vznik a vývoj nádoru jsou výsledkem mutací DNA, díky nimž může dojít až k rozvoji maligního fenotypu.<sup>13</sup>

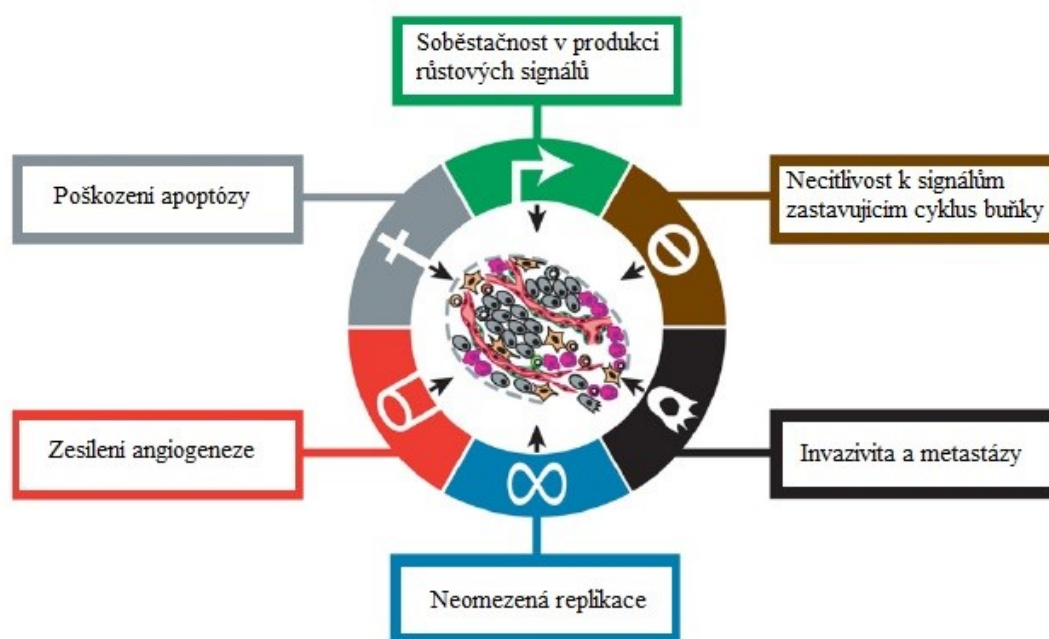
Mutace v genu pro aktivaci růstu a regulaci proliferace, protoonkogenu, tedy může způsobit nadměrné buněčné dělení. Onkogeny představují mutované protoonkogeny, které jsou zodpovědné za neoplastickou transformaci buňky. Přeměna protoonkogenů na onkogeny může probíhat různými způsoby – mutací, transdukcí, chromozomální translokací, inzerční mutagenezí a amplifikací. K nadměrné proliferaci dojde také inaktivací antiproliferačních genů a genů podporujících apoptózu – tumor-supresorových genů. Protoonkogeny a tumor-supresorové geny se řadí do mnoha skupin a kódují různé typy proteinů. Příkladem tumor-supresorového genu je retinoblastomový gen (Rb-gen), při jehož inaktivaci se odstraní důležitá brzda buněčného dělení a tím se zvyšuje pravděpodobnost nádorového bujení v senzitivních tkáních, zejména sítnice oka.<sup>14,15</sup>

Produkty onkogenů – onkoproteiny mohou být aktivní i bez fyziologických stimulátorů a mohou vyvolávat další buněčné dělení nezávisle na růstových faktorech. Mezi tyto onkoproteiny řadíme růstové faktory nádorových buněk, jež autokrinně stimulují dělení vlastních buněk (např. platelet derived growth factor – PDGF) a receptory pro růstové faktory (např. epidermal growth factor receptor – EGFR). Dále k onkoproteinům počítáme nereceptorové tyrosinkinasy (např. Src, Fes), serin/threoninkinasy (např. Raf, Mos), G-proteiny (Ras) a řadu transkripčních faktorů (např. Myc, Fos, Jun).<sup>16</sup>

### **1.1.7 CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK**

Během posledních deseti let, jsou nádory stále více uznávány jako orgány, jejichž složitost se blíží, nebo může být dokonce vyšší než u zdravých tkání. V průběhu vícestupňového vývoje nádoru buňky neustále mutují a získávají biologické vlastnosti, které jim umožňují další existenci, rychlejší růst a také rezistenci k léčbě. Mezi základní vlastnosti můžeme zařadit soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, vysokou schopnost invazivity a tvorbu metastáz, neomezenou replikaci, zesílení angiogeneze a poškození mechanismu apoptózy (Obr. 2). Podkladem pro vznik těchto vlastností

je nestabilita genomu plynoucí z neustálé replikace a vyřazení kontrolních mechanismů. „Mikroprostředí nádoru“ se dále značí vlastním energetickým metabolismem a schopností odolávat imunitnímu systému organismu. Objevení těchto vlastností nádorových buněk pomohlo k zavedení cílené terapie, kdy většina léků je zaměřena na specifické molekulární cíle v buňce, které jsou zodpovědné za zvláštní schopnosti nádorové buňky.<sup>17</sup>



**Obrázek 2.** Shrnutí znaků nádorových buněk. Upraveno dle citace<sup>17</sup>

## 1.2 TERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

### 1.2.1 HISTORIE A VÝVOJ

Ačkoliv nádorová onemocnění se dle studií vyskytují již od doby prehistorické, tak teprve na počátku minulého století věda pokročila natolik, aby bylo možné uvažovat o jejich léčbě. Až do dvacátých let 20. století se spoléhalo jen na léčbu chirurgickou, ke které se postupem času přidala možnost využití ionizujícího záření, tedy radioterapie. Od čtyřicátých let se díky objevu alkylačních látek a antimetabolitů začala používat i systémová léčba neboli chemoterapie, jež se i přes své negativní systémové účinky propracovala na jednu z hlavních léčebných metod. V sedmdesátých letech minulého století došlo k rozvoji nové metody –



imunoterapie a postupem času se ukázalo, že i kombinace uvedených metod, tzv. multimodální léčba efektivnější než jednotlivé metody zvláště.<sup>18</sup>

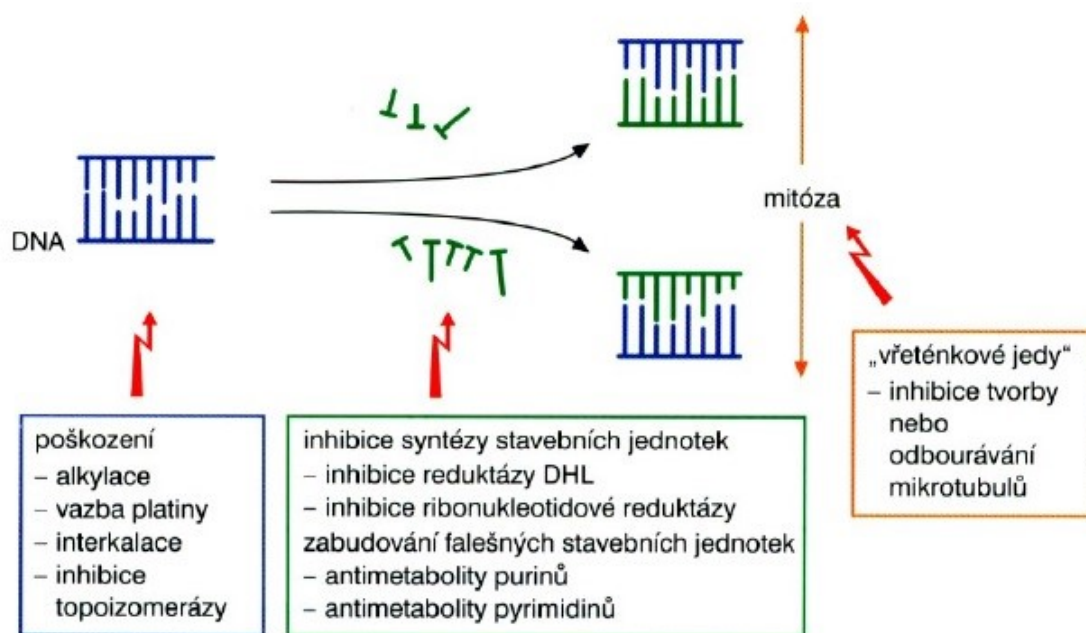
Díky pokrokům v oblasti genetiky a molekulární biologie se v posledních desetiletích začaly do praxe zavádět nové léčebné modalitty, které účinkují v jednotlivých fázích kancerogeneze a označují se názvem cílená léčba. Cílená léčba, především díky své specifitě a finanční náročnosti, však zatím nemůže nahradit chemoterapii. Z metod cílené terapie se nyní v praxi využívá účinku monoklonálních protilátek a inhibice tyrosinkinasy nízkomolekulárními látkami. Dalším výzkumem a rozvojem genové terapie se do budoucna otevírají další možnosti terapie nádorových onemocnění.<sup>18,19</sup>

Pro účinnou léčbu rakoviny je třeba také zlepšit a vyvinout nové strategie pro účinné dodávání chemoterapeutik přímo do nádorových buněk, neboť konvenční chemoterapeutika se v důsledku nespecifičnosti hromadí v nádorových i zdravých buňkách. Řešením je cílený transport zahrnující určitý ligand/receptor a charakterizujeme ho jako aktivní nebo pasivní. Aktivní cílení zahrnuje ligandem zprostředkované podání léku, kdy ligand je konjugován přímo na účinnou látku nebo na povrch nosného systému (liposom, nanočástice). Pasivní transport využívá výhody efektu EPR (Enhanced Permeability and Retention = zvýšená propustnost a retence), který nalezneme v nádorových tkáních. Cévní zásobení nádoru je nepravidelné, méně organizované a více porézní, což umožní malým částicím v řádu několika nanometrů procházet skrz endoteliální bariéru a hromadit se zde v důsledku nedostatečné funkčnosti lymfatické sítě nádorových buněk.<sup>2,20</sup>

### **1.2.2 KLASICKÁ CYTOSTATIKA**

Klasická neboli konvenční cytostatika blokuje progresi nádoru tím, že různými mechanismy cílí na základní buněčné struktury, jako DNA či mikrotubuly, a tak zpomalují nebo zastavují růst a množení nádorových buněk. Podstatou jejich účinku je vyšší toxicita pro rychle se dělící nádorové buňky oproti normálním buňkám. Ideální cytostatikum by mělo zničit nádorové buňky, aniž by zasáhlo normální buňky lidského těla. Bohužel současná věda ještě takové cytostatikum neobjevila.<sup>21,22</sup>

Cytostatika můžeme dle původu účinných látek a mechanismu účinku rozdělit do několika skupin (Obr. 3).



**Obrázek 3.** Mechanismy účinku cytostatik – shrnutí. Převzato z citace<sup>23</sup>

### 1.2.2.1 ALKYLAČNÍ LÁTKY

První skupinu tvoří léčiva, která poškozují DNA navázáním alkylového zbytku kovalentní vazbou na DNA. Tato alkylace DNA poté vede ke smrti buňky. Bohužel se cytotoxické působení nevyhýbá buňkám zdravé tkáně a vzniklé nežádoucí účinky se projevují hlavně u rychle se dělicích buněk. Napadena bývá nejčastěji kostní dřeň, trávicí trakt a funkce ovarií a varlat. Navíc tyto látky představují rizika pro lidské zdraví svými teratogenními a kancerogenními účinky.<sup>21,24,25</sup>

Jedná se o látky různé chemické struktury, které ve své molekule obsahují velmi reaktivní skupiny schopné vázat se na nukleofilní místa DNA. Z chemického hlediska je můžeme rozdělit do několika skupin. První tvoří dusíkaté yperity, z nichž nejpoužívanějším cytostatikem je cyklofosfamid. Je využíván pro terapii hematologických i solidních nádorů. Dalšími zástupci jsou melfalan, chlorambucil a ifosfamid. Druhou skupinu tvoří deriváty *N*-nitrosomočoviny. Jednotliví zástupci se liší charakterem substituentu na druhém atomu dusíku a teprve v organismu dojde k jejich přeměně na aktivní metabolity neenzymatickou cestou. Příkladem je karmustin, lomustin a nitrosomočovina nové generace fotemustin. Do třetí skupiny spadají komplexní sloučeniny platiny (např. cisplatina, oxaliplatina a její analog lobaplatina) a poslední skupinu tvoří látky různých chemických struktur, které taktéž působí alkylačním mechanismem. Jedná se o deriváty aziridinu (např.

thiotepa), derivát triazenu (dakarbazin) a estery methansufonové kyseliny s dvojsytnými alkoholy (busulfan).<sup>21,24</sup>

#### 1.2.2.2 ANTIMETABOLITY

Antimetabolity jsou odvozeny od endogenních látek významných pro syntézu a správnou funkci DNA a RNA. Jsou specifické převážně pro S-fázi buněčného cyklu, kdy dochází k replikaci DNA. Hlavními antimetabolity jsou analoga pyrimidinových bází (např. fluorouracil, cytarabin), analoga purinových bází (např. merkaptopurin, thioguanin) a analoga kyseliny listové (např. methotrexát). U prvních dvou skupin dochází k zabudování falešných stavebních jednotek a následné tvorbě falešných nukleových kyselin. U analog kyseliny listové je inhibována dihydrofolátreduktasa, což vede k nedostatku kyseliny tetrahydrolistové, která je nezbytná pro tvorbu purinových bází a tymidinu.<sup>15,26</sup>

#### 1.2.2.3 INTERKALAČNÍ LÁTKY

Začlenění do dvojitého vlákna DNA s následnou tvorbou komplexu je hlavním mechanismem účinku antracyklinových antibiotik. Doxorubicin a idarubicin jsou vysoce efektivní a široce používaná chemoterapeutika v léčbě mnoha typů rakoviny. Mimo jejich interkalační působení zasahují z důvodu oxidace lipidů i do buněčných membrán. Hlavním omezením užívání antracyklinů je kumulativní a na dávce závislá kardiotoxicita. Molekulární a buněčný mechanismus kardiotoxicity není ještě zcela objasněn, ale tento účinek se dá částečně eliminovat podáváním nižších dávek cytostatika, zapouzdřením antracyklinů v liposomech a podáním souběžně s chelátory železa (dexrazoxan) ve snaze vyladit reaktivní formy kyslíku.<sup>27</sup>

#### 1.2.2.4 INHIBITORY TOPOISOMERAS

Topoisomerasy jsou nezbytné pro hladký průběh replikace, neboť odstraňují nadšroubovicové vinutí DNA vzniklé replikací nebo transkripcí DNA. Topoisomerasa I je odpovědná za rozpojení a opětovné spojení přerušovaných řetězců, což umožní kontinuitu replikačního procesu. Oproti topoisomerase I, která se váže na jeden řetězec dvojspirály, topoisomerasa II přerušuje oba řetězce DNA. Pokud tyto enzymy blokuje inhibitory, nedochází v buňkách ke spojení řetězců a vzniklé zlomy způsobí smrt buňky. Mezi inhibitory topoisomerasy I se řadí deriváty kamptotecinu izolované z kůry čínského stromu *Camptotheca acuminata* – topotekan a irinotekan používané v léčbě kolorektálního karcinomu, nádorů plic

a vaječnicků. Etoposid a teniposid jsou izolované látky z kořene noholistu štítnatého (*Podophyllum peltatum*) a jsou inhibitory topoisomerasy II. Za inhibitory topoisomerasy II lze do jisté míry považovat i interkalační látky.<sup>28,29</sup>

#### 1.2.2.5 INHIBITORY MITÓZY

Inhibitory mitózy zabraňují dělení buněk tím, že interferují s polymerací a depolymerací mikrotubulů. Inhibici polymerace neboli růstu mikrotubulů, působí alkaloidy z barvínku růžového (*Vinca rosea*). Z této rostliny se získávají vinblastin a vinkristin, semisyntetickými deriváty jsou vindesin, vinorelbin a vinflunin. Vedle typických nežádoucích účinků cytostatik může navíc dojít i k zasažení periferních nervů, kde poškozením mikrotubulů axonu narušíme transport látek v neuronu. U těchto cytostatik je i riziko mnohočetné lékové rezistence.<sup>23,30</sup>

Novější skupinou jsou taxany, které způsobují inhibici depolymerace mikrotubulů. Z kůry tichomořského tisu (*Taxus brevifolia*) byl v roce 1969 izolován paklitaxel. Jeho uvedení do praxe však bylo poměrně komplikované. Překážky ve vývoji zahrnovaly jeho špatnou rozpustnost ve vodě, četné periferní neuropatie a vysoké riziko hypersenzitivní reakce, které se ale podařilo snížit díky premedikaci kortikosteroidy a antihistaminiky. Jeho semisyntetickým analogem je docetaxel a ve snaze o bezpečnější a účinnější derivát byl nedávno vyvinut *nab*-Paklitaxel. Tento derivát obsahuje paklitaxel vázaný na albumin, což umožní lepší transport tohoto špatně rozpustného léčiva v organismu a tím zvýší průnik k nádorovým buňkám.<sup>31,32</sup>

#### 1.2.2.6 VÝZNAM KLASICKÝCH CYTOSTATIK

Klasická cytostatika si zachovávají své místo v terapii nádorových onemocnění, ať už kvůli dlouhodobé zkušenosti s jejich podáváním, tak kvůli tomu, že v současné době nemáme bohužel pro některé diagnózy jiné alternativy k dispozici. Oproti novým protinádorovým léčivům, jejichž mechanismus účinku je přísně specifický, se klasická cytostatika dají použít k léčbě více typů nádorů.<sup>22</sup> Často se používají i kombinovaně dle terapeutických schémat, aby došlo ke zlepšení snášenlivosti a zvýšení účinnosti léčby. Neméně důležitou součástí léčby nádorového onemocnění je podpůrná terapie zahrnující medikaci proti zvracení, útlumu kostní dřeně a poškození sliznic.<sup>26</sup>

### **1.2.2.7 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY LÉČBY KONVENČNÍMI CYTOSTATIKY**

Zásah do rychle proliferujících buněk lidského organismu má za následek četné nežádoucí účinky. Rozsah těchto účinků je velmi široký; od závažných poškození až po účinky, které sice bezprostředně neohrožují život pacienta, nicméně výrazně snižují kvalitu života. Jako příklad lze uvést rozmazané vidění, konjunktivitidu nebo alopecii. Tyto jevy přitom nejsou ojedinělé, ale vyskytují se u většiny klasických cytostatik.<sup>22</sup>

Při protinádorové léčbě dochází k útlumu mnoha fyziologických funkcí. Výskyt a závažnost útlumu kostní dřeně závisí na kombinaci léčiv, režimu terapie a projevuje se neutropenií, trombocytopenií a anémií. Neplodnost může být následkem útlumu spermatogeneze. Z dalších typických negativních dopadů protinádorové léčby můžeme zmínit poruchy trávicího systému – průjem, nevolnost, zvracení a celkové oslabení imunitního systému projevující se zvýšenou náchylností k infekcím.<sup>26</sup>

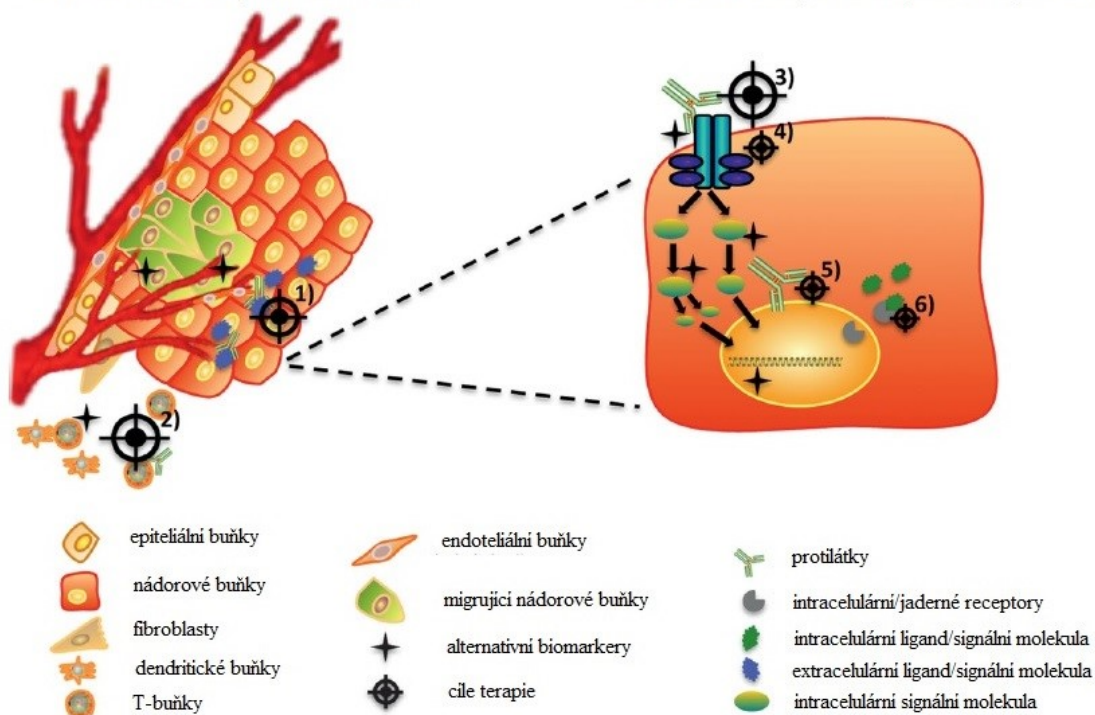
Bohužel ani po vyléčení se někteří pacienti nevyhnou tzv. pozdní toxicitě chemoterapie, která se projevuje jako periferní neuropatie, ototoxicita, nebo jako nejzávažnější kardiomyopatie končící v nejhrošším případě až selháním srdce. Po léčbě má pacient vyšší pravděpodobnost být zasažen dalším nádorem, zvláště v důsledku genetických mutací spojených s prodělanou radioterapií či chemoterapií. Pravděpodobnost výskytu klesá s věkem a je v průměru 1 – 2,5 %. U dětských nádorových onemocnění je výrazně vyšší, až 5 – 8 %.<sup>33</sup>

### **1.2.3 CÍLENÁ LÉČBA**

Molekulárně cílená léčba je definována jako druh léčby, která blokuje růst nádorových buněk tím, že reaguje s konkrétními molekulami zodpovědnými za proces kancerogeneze. (Obr. 4) Rostoucí počet schválených molekul zaměřených na terapii odpovídá stále rostoucímu významu tohoto léčebného postupu. Cílená léčba rakoviny přitahuje pozornost veřejnosti s nadějí, že v budoucnu bude možné nahradit systémovou chemoterapii. Očekává se od ní vyšší účinnost a menší škodlivost pro zdravé tkáně lidského organismu.<sup>34</sup> Nedávné pokroky v oblasti genomiky nádorových onemocnění a technologie sekvenování DNA umožnily provést komplexní mutační profilování nádorových buněk a poskytly tím základ pro personalizovanou medicínu v terapii rakoviny. Léčiva jsou pak navržena tak, aby pomohla řešit konkrétní genetické změny nutné pro růst a progresi rakoviny.<sup>35</sup>

A Zacílení na "mikroprostředí nádoru"

B Zacílení na signální dráhy nádorových buněk



**Obrázek 4.** Cílená terapie zaměřená na „mikroprostředí nádoru“ (A) zahrnuje vliv na (1) cévní zásobení a (2) převýchovu imunitního systému. V druhém případě působíme na samotné nádorové buňky, zejména na signální dráhy nádorových buněk (B) přes extracelulární (3) a intracelulární (4) části transmembránových receptorů. K intracelulárním cílům řadíme i jadernou signalizaci (5 a 6). Upraveno dle citace<sup>35</sup>

### 1.2.3.1 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Jedná se o skupinu látek fungující je v terapii nádorových onemocnění od devadesátých let 20. století. Jako monoklonální protilátky jsou označovány humanizované protilátky, které se vážou specificky na antigeny nádorových buněk. Nemohou proniknout plazmatickou membránou buňky a jsou určeny proti cílům vně buňky, tedy hlavně na buněčném povrchu. Poznáme je podle přípony „-mab“ v názvu léčiva. Pro léčbu solidních nádorů Food and Drug Administration (FDA) schválila čtyři druhy monoklonálních protilátek – bevacizumab, cetuximab, panitumumab a trastuzumab. Cílem působení bevacizumabu je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a je schválen pro terapii kolorektálního karcinomu, nemalobuněčného plicního karcinomu a metastazující rakoviny ledvin. Podobné terapeutické možnosti představuje i cetuximab. Místem účinku je však EGFR.<sup>34,36</sup>

Monoklonální protilátky nepůsobí jen samostatně, ale nabízejí další možnosti využití v terapii. Pro zesílení protinádorového účinku lze na ně navázat buněčný jed (toxin) nebo radioaktivní prvek. Mají své využití i jako systém pro podání léčiva nebo konjugát protilátka-léčivo. V případě konjugátu protilátka-cytostatikum (např. BR96-doxorubicin) se monoklonální protilátka naváže na nádorové buňky, cytotoxické léčivo je pohlceno do buňky, čímž dojde k indukci buněčné smrti. Tento způsob umožňuje vytvořit vysokou lokální koncentraci v nádorových buňkách a vzhledem k lokálnímu působení je účinnější a méně toxický. Dále nabízí možnost překonání rezistence vůči cytostatikům, neboť prochází přes membrány aktivní a pasivní endocytózou a cytostatikum nemůže být pumpováno z cytoplazmy buňky zpět do extracelulárního prostoru transmembránovými transportéry.<sup>34,37,38</sup>

### 1.2.3.2 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY

Druhou skupinu tvoří tzv. malé molekuly neboli small drugs. Jsou to nízkomolekulární organické sloučeniny (s molekulovou hmotností menší než 800) mající schopnost proniknout buněčnou membránou a působit na cíle uvnitř buňky. Cílená léčba nádoru je založena na myšlence, že zapnutím nebo vypnutím signálních drah můžeme kontrolovat růst nádorových buněk s minimálními účinky na buňky, u kterých tyto dysregulované signální dráhy nejsou dominantní. V názvu malých molekul nalezneme příponu „-ib“ značící inhibiční vlastnosti molekuly. Mnohé z těchto molekul byly vyvinuty jako inhibitory tyrosinkinas.<sup>34,36,39</sup>

### 1.2.3.3 INHIBITORY TYROSINKINAS

Tyrosinkinasa je enzym přenášející fosfátovou skupinu z ATP na cílovou molekulu, protein. Mohou být volně v cytoplazmě (tzv. nereceptorové tyrosinkinasy – nRTKs) nebo vázány na membráně (receptorové tyrosinkinasy – RTKs).<sup>40</sup>

Receptorové tyrosinkinasy (RTKs) mají vysokou afinitu pro mnoho růstových faktorů, cytokinů a hormonů. Fungují jako klíčové regulátory buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciaci a metabolismus. Fosforylace tyrosinových zbytků dalších proteinů reguluje jejich vlastnosti, enzymovou aktivitu, subcelulární lokalizaci a intermolekulární interakce. Vyvolá odpověď buňky tím, že pomáhá přenosu signálu z buněčné membrány přes cytoplazmu do jádra, kde probíhá kontrola genové exprese a vlastní aktivací či inhibicí transkripčních faktorů zde

můžeme ovlivnit genovou expresi cílových genů. Abnormální úroveň exprese genů kódujících tyrosinkinasy může způsobit zvýšení enzymové aktivity vedoucí k neregulovatelnému růstu a až nádorové transformaci. V rámci protinádorové léčby využíváme inhibitory tyrosinkinasy, kdy zablokujeme přenos signálu a zastavíme tím buněčné dělení a růst buněk.<sup>41,42</sup> Tyto inhibitory mohou působit přímo na buněčné procesy nebo mohou cílit mikroprostředí nádoru. Jako příklady obou způsobů můžeme zmínit dvě rodiny receptorů: EGFR/ErbB/HER (epidermal growth factor receptor/erythroblastosis receptor B) a FGFR/PDGFR/VEGFR (fibroblast growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, vascular endothelial growth factor receptor).

EGFR rodina (nazývána také ErbB nebo HER rodina) obsahuje čtyři transmembránové receptorové tyrosinkinasy HER1–4. Neregulovaná exprese a aktivita EGFR (neboli HER1), HER2 a HER3 převládá v nádorovém bujení.<sup>43</sup> Nadměrná tvorba HER2 se vyskytuje u 30 % případů rakoviny prsu a koreluje s tvorbou metastáz, častějšími recidivami a kratším přežitím pacientů. Odpovídá také za špatnou prognózu u rakoviny tlustého střeva, vaječníků a močového měchýře. Inhibitory a protilátky cílené na HER2 se již vyskytují v terapii. Trastuzumab je první protilátka objevená pro zacílení na HER2 a v současné době je schválena u pacientů s rakovinou prsu. Účinnými nízkomolekulárními inhibitory pro EGFR jsou gefitinib a erlotinib. Duální EGFR/HER2 inhibitor lapatinib je používám u pokročilého a metastazujícího karcinomu prsu.<sup>44,45</sup>

Rodina FGFR/PDGFR/VEGFR hraje důležitou roli při tvorbě cévního zásobení. Jak již bylo zmíněno výše, zesílení angiogeneze je jeden z charakteristických znaků nádorových buněk. To znamená, že zacílení na FGFR/PDGFR/VEGFR multikinasovým inhibitorem může být slibným přístupem pro antiangiogenní terapii.<sup>46</sup> Solidní tumory produkují různé angiogenní faktory – VEGF, PDGF, FGF a hepatocyte growth factor (HGF). VEGF je hlavní regulátor s přímým efektem na endoteliální buňky. Na principu neutralizace VEGF působí protilátka bevacizumab. Sorafenib a sunitinib jsou inhibitory tyrosinkinasy VEGFR a PDGFR uplatňující se v terapii renálního a hepatocelulárního karcinomu.<sup>47</sup>

Z nereceptorových tyrosinkinasy lze zmínit fúzní protein BCR-ABL (breakpoint cluster region – Abelson tyrosine kinase). ABL má kinasovou aktivitu a je přísně



regulován. Může však dojít k translokaci, kdy fúzí vzniká chimérický protein BCR-ABL s tyrosinkinasovou aktivitou, který narušuje řadu signálních drah a způsobuje leukemický charakter buňky. Běžně jej nalezneme u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). Imatinib je první nízkomolekulární inhibitor používaný k léčbě rakoviny. Je indikován v terapii CML, kde v porovnání s předchozími terapeutickými režimy vykazoval vyšší rychlost odezvy, lepší prognózu a celkové přežití u pacientů s CML. Avšak velkým problémem je rezistence vznikající v důsledku mutací v kinasové doméně ABL.<sup>48,49</sup>

#### **1.2.4 CHEMOIMUNOTERAPIE**

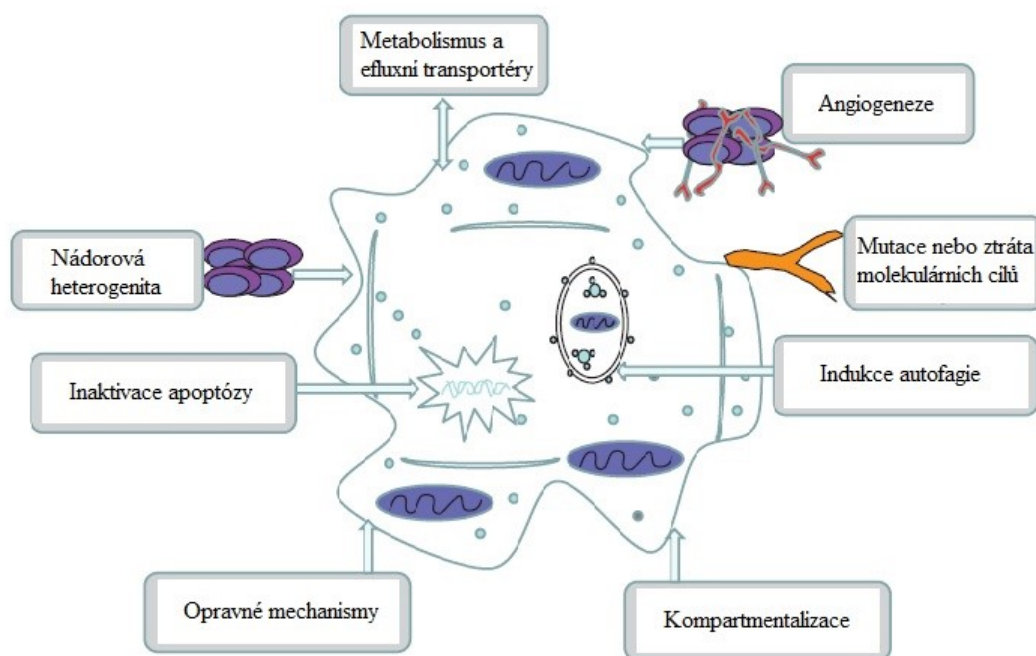
Ve snaze zvýšit šanci na vyléčení dochází v terapii rakoviny k různým kombinacím léčebných postupů. Kombinace chemoterapie s imunoterapií může v některých případech vykazovat synergistický účinek. Z klasických cytostatik se používají dakarbazin, cisplatina a karboplatina doplněné o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) nebo interleukin 2 (IL-2). Tohoto se využívá v terapii metastazujícího melanomu.<sup>50</sup>

K léčbě rakoviny lze využít i speciální vakcíny. Mohou aktivně indukovat nádorově specifickou imunitní odpověď vyvoláním jak humorální (protilátkové), tak buněčné (T-buňky) imunitní odpovědi. Výhody vakcín spočívají ve vysoké specifitě, minimálních vedlejších účincích a zisku trvalého léčebného efektu v důsledku imunologické paměti. První individuální terapeutická vakcína proti rakovině sipuleucel-T byla schválena FDA pro léčbu pokročilého karcinomu prostaty. Schválení léku speciálně navrženého pro indukci tumor specifické imunitní odpovědi znamená začátek pro zcela odlišný přístup k terapii rakoviny.<sup>51</sup>

#### **1.2.5 REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK K LÉČBĚ**

Jeden velký problém mají konvenční i novější cytostatika společný – rezistenci. Nádory jsou geneticky variabilní a cytostatika působí na nádor selekčním tlakem, což způsobuje růst rezistentní buněk. Rezistenci podporují mutace, amplifikace enzymů a overexprese transportních mechanismů. Během léčby se pak rozvíjí rezistence na léčivo a mnohdy i na kombinaci léčiv. Nízkomolekulární inhibitory RTK a konvenční cytostatika sice působí odlišnými mechanismy, ale stále se jedná o tělu cizí látky a lidský organismus disponuje mnoha mechanismy, jak se bránit průniku cizích látek do buněk. Mezi mechanismy rezistence na systémovou léčbu (Obr. 5) řadíme nádorovou heterogenitu, snížený transport cytostatika do buňky

nebo zvýšený výstup cytostatika ven z buňky a změnu v cílovém místě účinku cytostatika. Jedním z důležitých mechanismů rezistence u cytotoxické chemoterapie jsou také opravy DNA, kterými si buňky chrání svou genetickou informaci. Jednotná příčina vzniku rezistence však neexistuje.<sup>22,23,26,52</sup>



**Obrázek 5.** Shrnutí mechanismů, kterými se rakovinné buňky stávají rezistentní k terapii. Upraveno dle citace<sup>52</sup>

## 1.3 DNA DAMAGE RESPONSE – ODPOVĚĎ NA POŠKOZENÍ DNA

### 1.3.1 POŠKOZENÍ DNA

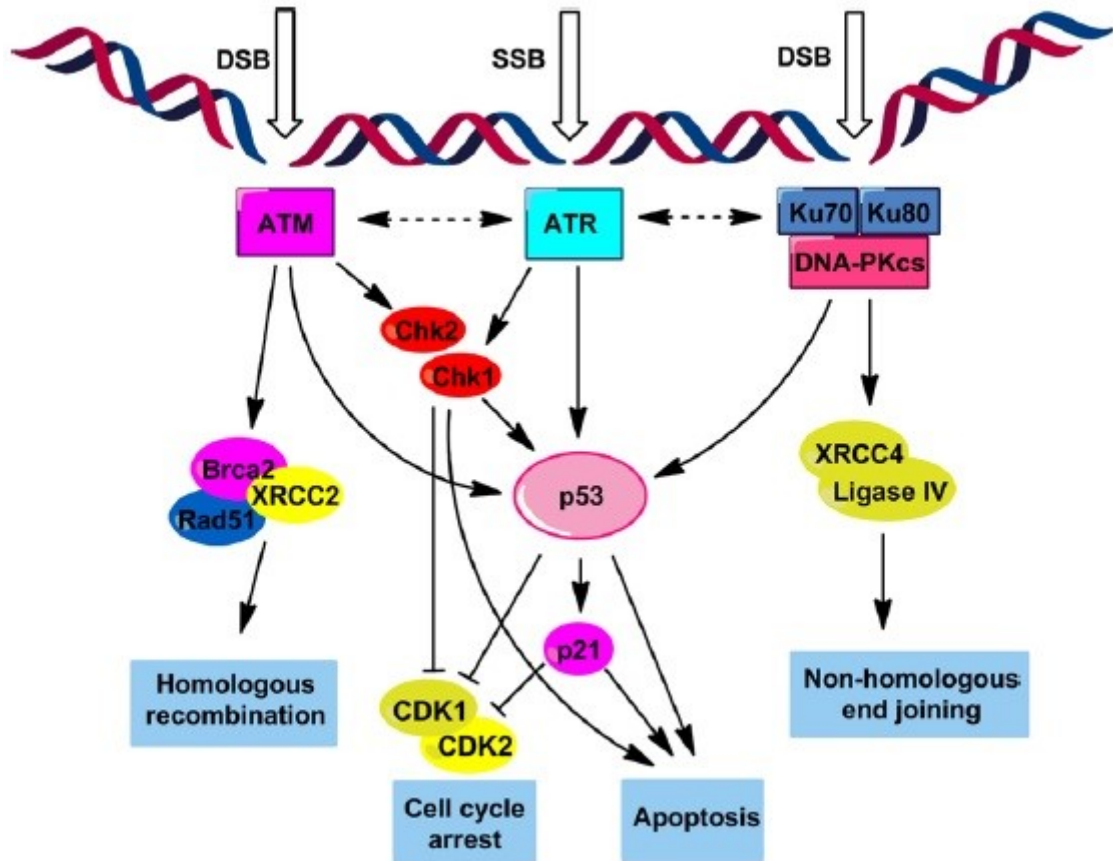
Každý den dochází v každé buňce v důsledku různých vlivů k milionům poškození DNA. Neschopnost rozpoznat a přesně opravit tyto léze většinou způsobí smrt buňky, ale může vést až ke škodlivým mutacím a vzniku rakoviny. Zachování genomové integrity je základní proces pro udržení homeostázy, a proto buňky disponují specifickými signálními dráhami jako odpověď na DNA poškození, souhrnně označované jako DNA damage response (DDR).<sup>1</sup>

Poškození DNA může vznikat různými mechanismy. Některé DNA aberace vznikají prostřednictvím fyziologických procesů, ať už při chybném párování během replikace, nebo při špatné funkci topoisomeras I a II. Poškození DNA může být vyvoláno i volnými radikály, zejména reaktivními formami kyslíku a dusíku,

které v organismu vznikají během metabolických dějů nebo působením chemických látek. Chemické látky poškozující párování bází, blokující replikaci a transkripci jsou zodpovědné za tvorbu jednořetězcových (single-strand breaks – SSBs) a dvouřetězcových (double-strand breaks – DSBs) zlomů. DSBs se sice neobjevují často, ale je velmi těžké je opravit a jsou pro buňku extrémně toxické. Tento typ zlomů je způsoben ionizujícím zářením a některými cytostatiky, například interkalačními látkami.<sup>53</sup> Typů poškození DNA je celá řada a v následujících kapitolách se budu převážně věnovat DSB, které mají souvislost s mojí prací.

### **1.3.2 FOSFATIDYLINOSITOL-3-KINASAM PŘÍBUZNÉ PROTEIN KINASY A OPRAVA DVOUŘETĚZCOVÝCH ZLOMŮ**

Pokud dojde ke zlomení obou řetězců DNA, aktivují se proteinové kinasy ataxia telangiectasia mutated (ATM) a ataxia telangiectasia a Rad3 related (ATR) a DNA dependentní proteinkinasa (DNA-PK). ATR je sice spojována převážně se SSB, nicméně při DSB také dochází k její aktivaci a kooperaci s ATM.<sup>54</sup> Při amplifikaci signálu dochází k aktivaci mnoha různých kinas a proteinů (Obr. 6). Mezi nejlépe prostudované cíle těchto kinas řadíme checkpoint kinasy 1 a 2 (Chk1 a Chk2) a protein p53. Působí tak, že různými mechanismy snižují aktivitu cyklin-dependentní kinasy (CDK). Inhibice CDK zpomalí nebo zastaví buněčný cyklus, tím buňka získá více času na opravu DNA, která je zprostředkována dvěma způsoby – homologní rekombinací (HR) a nehomologním spojováním konců (NHEJ; Obr. 6). Pokud poškození nemůže být odstraněno, dlouhodobá aktivace DDR vyvolává buněčnou smrt apoptózou nebo trvalé zastavení buněčného cyklu.<sup>28,53</sup>



**Obrázek 6.** Zjednodušené zobrazení DNA damage response v návaznosti na SSB a DSB. ATM, ATR a DNA-PK reagují na poškození DNA a spustí kaskádu dějů, při kterých dojde k aktivaci velkého množství substrátů a proteinů. ATM aktivuje Chk2, ATR spouští převážně Chk1 a společně s DNA-PK fosforylují centrální regulátor p53, který reguluje mnoho proteinů nezbytných pro opravu DNA, buněčný cyklus a apoptózu. Hlavním cílem je zpoždění buněčného cyklu a oprava způsobených škod – pomocí HR a NHEJ. HR je aktivována hlavně ATM a zahrnuje mnoho proteinů, včetně proteinu breast cancer 2 (Brca2), jehož mutace je jednou z příčin vzniku rakoviny prsu a ovárií, Rad51 a XRCC2. NHEJ je naopak primárně regulované DNA-PK a zahrnuje mimo jiné i proteiny DNA ligasu IV a XRCC4. Převzato z citace<sup>55</sup>

ATM, ATR a DNA-PK jsou členy rodiny atypických proteinkinás příbuzných fosfatidylinositol-3-kinasám (PI3K). Fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K) a fosfatidylinositol-3-kinasám příbuzné proteinkinasy (PIKK) jsou dvě rodiny kinás, které mají nepostradatelnou roli při regulaci buněčné proliferace, metabolismu a při odpovědích na různé typy stresu, včetně poškození DNA. Výsledkem aktivace

PI3K je tvorba fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu v membráně, který funguje jako druhý posel přes Akt (protein kinasa B) na další cíle, z nichž nejvýznamnější je mammalian target of rapamycin (mTOR), který je také členem PIKK rodiny. mTOR poté funguje jako centrální regulátor buněčného růstu, proliferace a energetického metabolismu. U mnoha chorob je dráha PI3K/Akt/mTOR deregulována. Nejedná se jen o rakovinu, ale i řadu dalších patologických stavů včetně trombózy, diabetu a jiných zánětlivých a autoimunitních onemocnění.<sup>55</sup>

PIKK je rodina šesti serin/threoninových proteinkinás, které sdílejí kinasovou doménu s PI3K, a tudíž jsou odlišné od normálních proteinkinás. Patří zde mimo ATM, ATR, DNA-PK a mTOR také human suppressor of morphogenesis in genitalia 1 (hSMG-1) a transformation/transcriptionassociated protein (TRRAP – jediný člen bez kinasové aktivity). První tři společně s hSMG-1 hrají klíčovou roli v reakci na genotoxické působení. ATM kinasa je pojmenovaná po autozomálně recesivním onemocnění ataxia telangiectasia, způsobené právě mutací v *ATM* genu. Projevuje se mimo ataxie a telangiectasie (rozšíření drobných kapilár) hlavně vysokou náchylností k poškození DNA a s tím spojenému zvýšenému riziku vzniku rakoviny.<sup>56</sup>

Až 70 % DSB je opravováno pomocí NHEJ, které je řízeno DNA-PK. Tato kinasa je tvořena katalytickou podjednotkou (DNA-PKcs) a dvěma Ku podjednotkami (Ku70 a Ku80).<sup>55,57</sup> Podjednotky Ku jsou navázány na DNA a při zlomení obou řetězců aktivují DNA-PKcs, která se na zlomené konce napojuje. Samotná DNA-PK má tvar otevřeného kruhu a při aktivaci dokáže DNA zcela obejmout a tím aktivovat její opravu.<sup>58</sup>

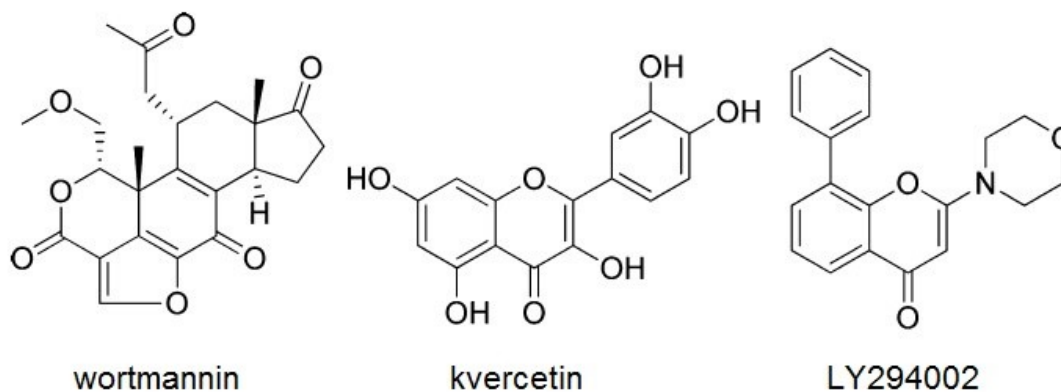
### 1.3.3 VYUŽITÍ OPRAV DNA V LÉČBĚ

Ionizující záření a genotoxické látky mají v terapii rakoviny stále velmi silné postavení, i přes jejich závažné nežádoucí účinky a častou rezistenci způsobenou opravami DNA a poruchami apoptózy. Velká naděje je proto vkládána do výzkumu DDR, jako možnosti zvýšení účinnosti stávající léčby. Nádorové buňky mají navíc signální dráhy DDR často poškozené v důsledku mutací, a proto tento způsob léčby mohl i selektivně zacílit tyto nádorové buňky a neovlivňovat buňky zdravé s neporušenými komponentami DDR.<sup>55</sup>

Pro tento účel je zkoumána celá řada různých cílů. Nejpokročilejší jsou inhibitory poly (ADP-ribosa) polymerasy (PARP), kde je již první inhibitor (olaparib) schválen pro léčbu BRCA-mutované rakoviny vaječníků.<sup>59</sup> V současné době jsou velmi intenzivně vyvíjeny inhibitory ATM, ATR a DNA-PK kinas, od kterých se očekává, vzhledem k jejich významným rolím v DDR, velmi silná sensibilizace nádorových buněk k řetězcovým zlomům DNA.

#### 1.3.4 INHIBITORY ATM, ATR a DNA-PK

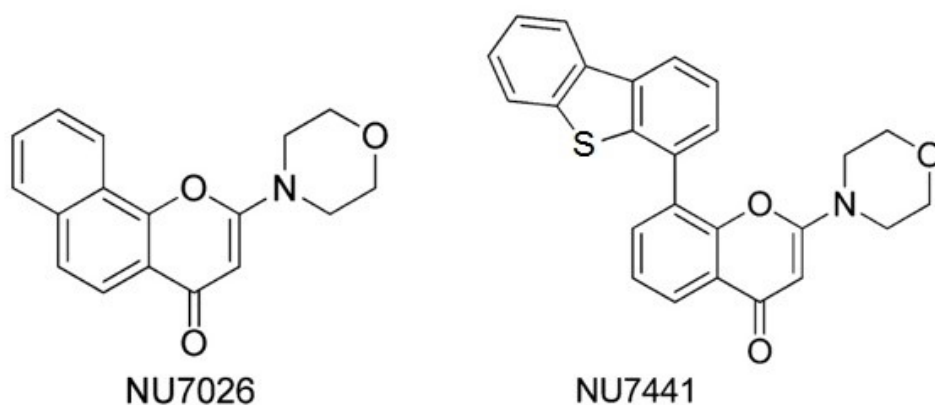
Prvním objeveným inhibitorem PI3K a zároveň PIKK byl wortmannin (Obr. 7) vyznačující se velmi silnou a ireverzibilní inhibicí. Z důvodu nízké selektivity, špatné stability a toxicity se wortmannin nedostal do podrobnějších biologických testů. Prvním syntetickým inhibitorem je LY294002.<sup>60</sup> Tento derivát odvozený od kvercetinů byl už selektivnější, ale stále špatně rozpustný ve vodě, měl nízkou biologickou dostupnost a byl velmi rychle metabolizován. Jeho působení na PI3K, DNA-PK a další kiny byly také velmi široké, aby se o něm dalo uvažovat jako o potenciálním léčivu. Jednoduchá struktura LY294002 ukázala důležité informace pro další vývoj již selektivních inhibitorů. LY294002 funguje jako kompetitivní inhibitor na vazebném místě pro ATP u PI3K, které je velmi podobné i u PIKKs (zvláště mTOR, DNA-PK). Nejdůležitější částí struktury LY294002 je morfolinový kruh tvořící vodíkovou vazbu s valinem 882 v aktivním místě PI3K podjednotky p110 $\gamma$ . Tato interakce hraje důležitou roli v enzymové inhibici a představuje základní kámen ve vývoji nových PI3K a PIKK inhibitorů. Modifikace dalších částí struktury vedla k přípravě mnoha derivátů se zvýšenou aktivitou i selektivitou k jednotlivým kinasám.<sup>54,55,60,61</sup>



**Obrázek 7.** Struktura prvních inhibitorů PI3K.

V současné době existují dvě vývojové cesty modifikování LY294002. První tvoří látky zaměřené na inhibici PI3K a mTOR a druhou sloučeniny vyvolávající inhibici DNA-PK, přičemž inhibitory PI3K a mTOR jsou mnohdy již LY294002 velmi vzdáleny a podobají se mu jen morfolinovým kruhem. Mnohé z těchto sloučenin mají dvojí aktivitu – PI3K/DNA-PK nebo PI3K/mTOR. Navzdory společnému původu, jen malá část z těchto inhibitorů vykazuje aktivitu vůči ATM nebo ATR a jejich inhibitory jsou obvykle nemorfolinové struktury.<sup>55</sup> S ohledem na cíl své práce se v této kapitole budu věnovat pouze DNA-PK a ATM inhibitorů, ze kterých plánované látky vycházejí.

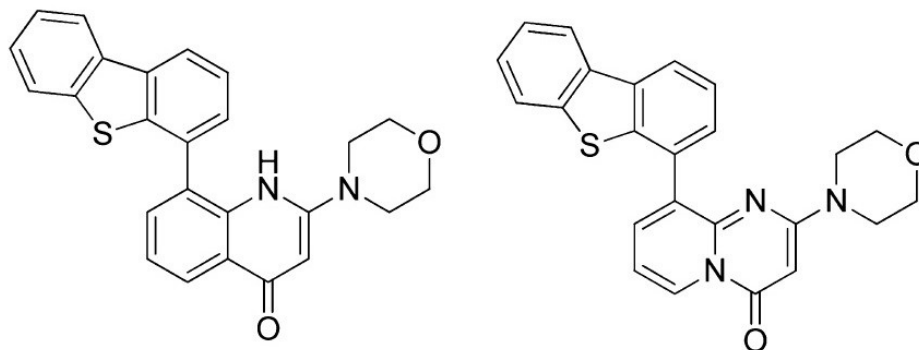
S cílem vytvořit selektivní inhibitory DNA-PK bylo syntetizováno mnoho derivátů LY294002. Jeden z prvních opravdu účinných byl chromonový derivát NU7026, který vykazoval 50× vyšší aktivitu vůči DNA-PK než ostatním PI3K a zvyšoval účinek cytostatik včetně idarubicinu, doxorubicinu, etoposidu a dalších (Obr. 8). Jeho velkou nevýhodou byla metabolická nestálost vedoucí až k otevření morfolinového kruhu, což způsobilo jeho rychlé odstranění z krevní cirkulace. Jeden z nejselektivnějších a zároveň nejúčinnějších inhibitorů DNA-PK odvozených od LY294002 je NU7441. Údaje z farmakodynamických studií potvrdily, že NU7441 působí silnou chemo- a radiosensibilizaci, ale omezená rozpustnost ve vodě a nízká biologická dostupnost po perorálním podání omezily další biologické hodnocení této sloučeniny.<sup>55,62</sup>



**Obrázek 8.** Struktury selektivních inhibitorů DNA-PK.

Vysoká aktivita NU7441 vedla k přípravě mnoha sloučenin (deriváty chinolinonů a pyridopyrimidonů (Obr. 9)) s podobnými strukturálními rysy s cílem nalézt

inhibitory se srovnatelnými, nebo dokonce vylepšenými vlastnostmi. Mimo obměny aromatických substituentů se také obměňovalo chromonové jádro. Tyto látky překvapivě vykázaly téměř totožné vlastnosti jako originální NU7441.<sup>62</sup>

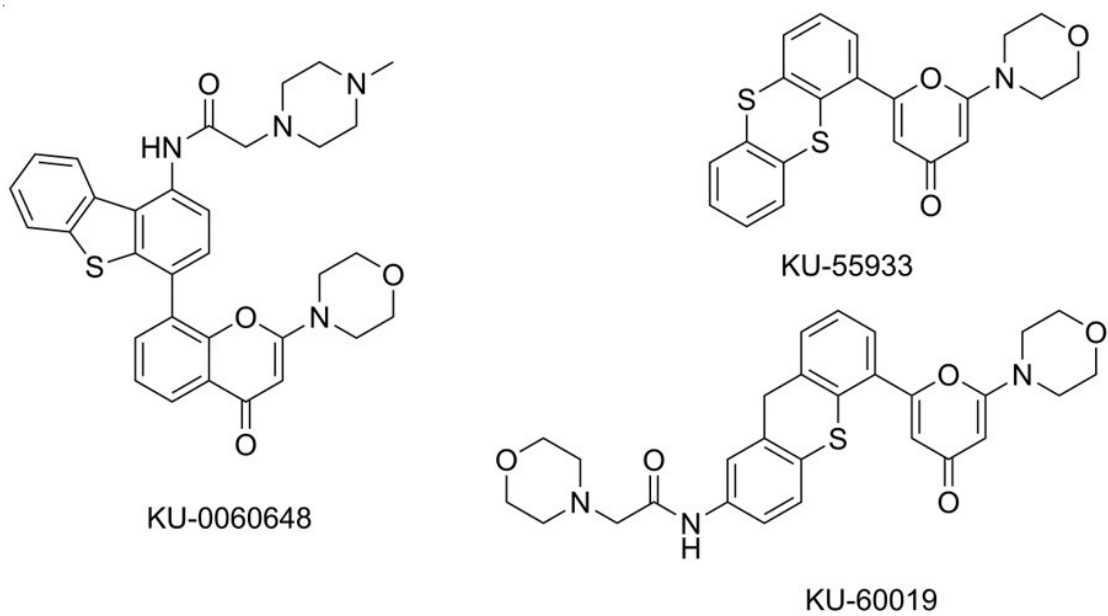


**Obrázek 9.** Struktury derivátů odvozených od chinolin-4-onu (vlevo) a od pyridopyrimidin-4-onu (vpravo).

Základní problém připravených DNA-PK inhibitorů byla jejich špatná rozpustnost a nízká biodostupnost. S cílem dosáhnout vyšší rozpustnosti byl připraven derivát KU-006048 (Obr. 10). Tento derivát NU7441 ovšem neinhibuje pouze DNA-PK, ale překvapivě dobře inhibuje i PI3K. V preklinických studiích ukázal dobrou biodostupnost po perorálním podání a vhodný farmakokinetický profil pro budoucí testování. Je však zapotřebí tyto vlastnosti ověřit v dalších *in vivo* testech. Inhibitory DNA-PK jsou studovány již druhé desetiletí a pokroky v této oblasti přicházejí pomalu. Nicméně nedávno již vstoupily dva selektivní inhibitory DNA-PK do první fáze klinického hodnocení s cílem zhodnotit bezpečnost a účinnost těchto látek v kombinaci s radioterapií a chemoterapií. Jedná se o inhibitor CC-122 s atypickou nemorfolinovou strukturou a MSC2490484A, který zatím nemá zveřejněnou strukturu.<sup>55,62-64</sup>

Deriváty KU-55933 a z něj odvozený KU-60019, jsou jediným příkladem ATM inhibitorů přímo vycházející ze struktury LY294002. Tyto deriváty vykazují vynikající inhibici ATM se 100× vyšší selektivitou vůči ATM než DNA-PK a dalším PIKK a také silnou radiosensibilizaci nádorových buněk.<sup>65</sup>

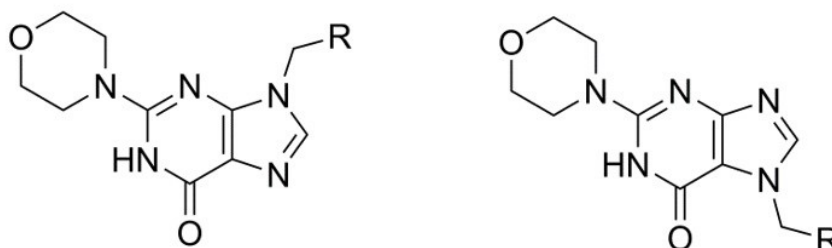




**Obrázek 10.** Struktury duálního inhibitoru DNA-PK a PI3K KU-0060648 a dvou selektivních ATM inhibitorů KU-55933 a KU-60019.

## 2 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem této práce bylo připravit sérii nových potenciálních DNA-PK inhibitorů vycházejících ze základního inhibitoru LY294002, které budou následně testovány jako chemosensibilizační a radiosensibilizační agens (Obr. 12). Jako jádro nových derivátů bude použit 1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on a 1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on, které mají odlišné rozložení elektronů v cyklu oproti chromonu a také více dusíků, které slouží jako akceptory vodíkových vazeb. K tomuto heterocyklu bude připojen morfolin, který je klíčový pro inhibici DNA-PK, a dále budou do poloh 7- a 9- připojovány různé aromatické substituenty přes methylenový můstek. Substituenty v poloze 9- purinového cyklu, by měly zaujímat podobný prostor jako aromatická část inhibitoru NU7441, proto se od těchto derivátů očekává silná inhibice DNA-PK.



**Obrázek 11.** Obecné struktury připravovaných derivátů, R = aromatický substituent.

### 2.1 SYNTETICKÁ ČÁST

#### 2.1.1 OBECNÁ SYNTETICKÁ ČÁST

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 hmotnostní spektrometrii byl využitý 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, který je spojený 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.

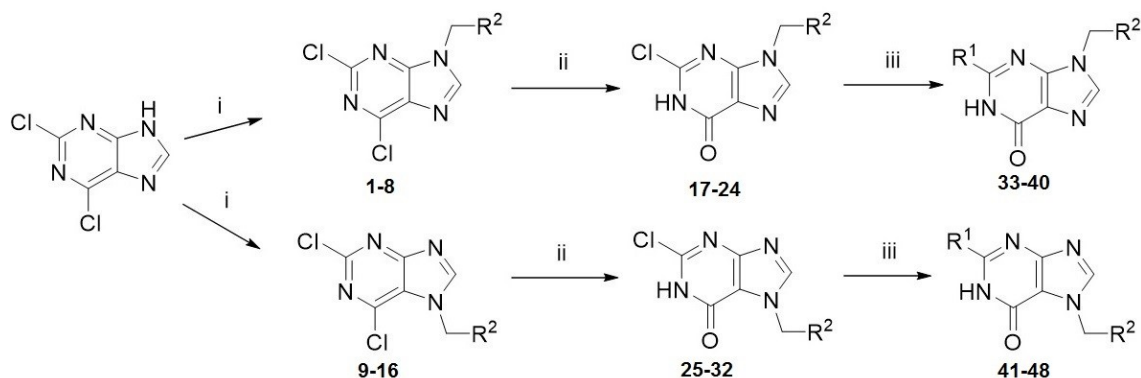
<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla změřena pomocí Varian S500 spektrometru (500 a 126 MHz) v CDCl<sub>3</sub> nebo DMSO-*d*<sub>6</sub>. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v ppm a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (7,26 pro <sup>1</sup>H, 77,16 pro <sup>13</sup>C v CDCl<sub>3</sub> a 2,50 pro <sup>1</sup>H, 39,7 pro <sup>13</sup>C v DMSO-*d*<sub>6</sub>). 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 autosamplerem Explorer Hybrid 6/12.

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

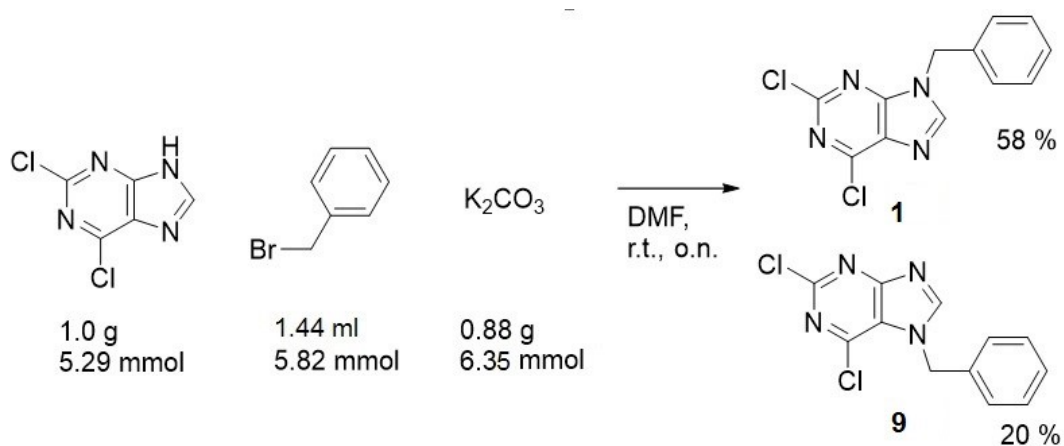
### 2.1.2 OBECNÉ SCHÉMA SYNTÉZY

Syntéza derivátů 2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu a 2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-onu probíhala v několika krocích, které jsou zobrazeny ve Schématu 1. V prvním kroku byly k 2,6-dichlorpurinu připojeny různě substituované benzylové substituenty (do polohy 7- a 9-), přičemž jednotlivá analoga (**1-8** a **9-16**) od sebe byla oddělena sloupcovou chromatografií. Ve druhém kroku došlo k hydrolýze pomocí hydroxidu sodného na 2-chlor-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on nebo 2-chlor-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on, ke kterému byl následně připojen pomocí mikrovlnného záření morfolin za vzniku finálních látek **33-40** a **41-48**. Pozice jednotlivých substituentů byly potvrzeny 2D NMR experimenty.



**Schéma 1** Reakční schéma syntézy derivátů 2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-onu a 2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on, kde  $R^1$  je morfolin-4-yl a  $R^2$  je aromatický substituent. Reagencie a podmínky: i) příslušný benzylbromid,  $K_2CO_3$ , DMF, r.t.; ii) 1M NaOH, 100 °C; iii) morfolin, *tert*-butanol, MW, 110 °C, 200 W, 300 psi

### 2.1.3 SYNTÉZA 9-BENZYL-2,6-DICHLOR-9*H*-PURINU (1), 7-BENZYL-2,6-DICHLOR-7*H*-PURINU (9) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (2-8 A 10-16)



Suspenze 2,6-dichlorpurinu (1 g; 5,29 mmol),  $K_2CO_3$  (0,88 g; 6,35 mmol) v dimethylformamidu (10 ml) byla míchána za laboratorní teploty pod inertní atmosférou 30 minut. Poté byl přidán benzylbromid (1,44 ml; 5,82 mmol) a reakce byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Do reakční směsi bylo poté přidáno 100 ml vody a směs byla extrahována ethyl-acetátem. Organická vrstva byla ještě dvakrát vytřepána ethyl-acetátem k odstranění zbytků dimethylformamidu, sušena  $Na_2SO_4$  a odpařena. Jednotlivá analoga **1** a **9** byla od sebe oddělena sloupcovou

chromatografií s mobilní fází petrolether:ethyl-acetát 4:1, přičemž analog **1** byl majoritní a eluován z kolony jako první.

#### **9-benzyl-2,6-dichlor-9H-purin (1)**

Bílá pevná látka, 0,86 g, výtěžek 58 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,06 (s, 1H), 7,40 – 7,37 (m, 3H), 7,33 – 7,30 (m, 2H), 5,42 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,15, 153,12, 151,83, 145,49, 133,95, 130,61, 129,33, 129,03, 128,04, 48,00. ESI-HRMS:  $m/z$  279,0197  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4]^+$  279,0199). Teplota tání 141,1 – 147,1 °C.

#### **7-benzyl-2,6-dichlor-7H-purinu (9)**

Bílá pevná látka, 0,30 g, výtěžek 20 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,25 (s, 1H), 7,43 – 7,37 (m, 3H), 7,20 – 7,16 (m, 2H), 5,67 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,60, 153,30, 150,35, 143,91, 134,09, 129,43, 129,06, 127,04, 121,73, 50,88. ESI-HRMS:  $m/z$  279,0198  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4]^+$  279,0199). Teplota tání 144,0 – 146,3 °C.

Analogicky byly připraveny i další deriváty **2-8** a **10-16**.

#### **2,6-dichlor-9-(3,4-dichlorbenzyl)-9H-purin (2)**

Bílá pevná látka; výtěžek 61 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,10 (s, 1H), 7,48 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,42 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,17 (dd,  $J = 8,3, 2,2$  Hz, 1H), 5,39 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,47, 152,97, 152,22, 145,08, 134,07, 133,63, 133,57, 131,37, 130,63, 129,89, 127,18, 46,78. ESI-HRMS:  $m/z$  348,9385  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_4\text{N}_4]^+$  346,9419). Teplota tání 169,9 – 174,0 °C.

#### **2,6-dichlor-7-(3,4-dichlorbenzyl)-7H-purin (10)**

Bílá pevná látka, výtěžek 17 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,30 (s, 1H), 7,48 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,98 (dd,  $J = 8,3, 2,2$  Hz, 1H), 5,64 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,65, 153,74, 150,20, 143,82, 134,47, 133,89, 133,58, 131,49, 128,78, 125,95, 121,52, 49,62. ESI-HRMS:  $m/z$  348,9303  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_4\text{N}_4]^+$  346,9419). Teplota tání 179,5 – 184,0 °C.

#### **2,6-dichlor-9-(4-isopropylbenzyl)-9H-purin (3)**

Bílá pevná látka, výtěžek 54 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,06 (s, 1H), 7,25 – 7,24 (m, 4H), 5,38 (s, 2H), 2,91 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,24 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,07, 151,74, 149,97, 145,57, 131,26, 130,62, 128,17, 127,92, 127,38, 47,81, 33,81, 23,80. ESI-HRMS:  $m/z$  321,0665  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4]^+$  321,0668). Teplota tání 81,0 – 84,4 °C.

#### **2,6-dichlor-7-(4-isopropylbenzyl)-7H-purin (11)**

Bílá pevná látka, výtěžek 25 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,22 (s, 1H), 7,28 – 7,23 (m, 2H), 7,14 – 7,10 (m, 2H), 5,63 (s, 2H), 2,92 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,24 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,61, 153,21, 150,31, 150,08, 143,91, 131,27, 127,49, 127,31, 121,74, 50,75, 33,80, 23,80. ESI-HRMS:  $m/z$  321,0665  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4]^+$  321,0668). Teplota tání 114,5 – 120,4 °C.

#### **2,6-dichlor-9-(4-chlorbenzyl)-9H-purin (4)**

Bílá pevná látka, výtěžek 52 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,07 (s, 1H), 7,39 – 7,35 (m, 2H), 7,29 – 7,25 (m, 2H), 5,40 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,30, 153,03, 152,03, 145,23, 135,18, 132,45, 130,63, 129,57, 129,40, 47,32. ESI-HRMS:  $m/z$  312,9805  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{N}_4]^+$  312,9809). Teplota tání 154,8 – 158,6 °C.

#### **2,6-dichlor-7-(4-chlorbenzyl)-7H-purin (12)**

Bílá pevná látka, výtěžek 20 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,27 (s, 1H), 7,41 – 7,34 (m, 2H), 7,14 – 7,08 (m, 2H), 5,66 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163,60, 153,45, 150,26, 143,84, 135,13, 132,71, 129,65, 128,28, 121,60, 50,18. ESI-HRMS:  $m/z$  312,9803  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{N}_4]^+$  312,9809). Teplota tání 188,0 – 189,8 °C.

#### **2,6-dichlor-9-(4-methoxybenzyl)-9H-purin (5)**

Bílá pevná látka, výtěžek 54 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,03 (s, 1H), 7,30 – 7,26 (m, 2H), 6,92 – 6,88 (m, 2H), 5,34 (s, 2H), 3,81 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160,07, 153,04, 151,72, 145,43, 129,70, 129,41, 125,83, 114,66, 114,32, 55,32, 47,64. ESI-HRMS:  $m/z$  309,0304  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}]^+$  309,0304). Teplota tání 123,5 – 128,2 °C.

**2,6-dichlor-7-(4-methoxybenzyl)-7H-purin (13)**

Bílá pevná látka, výtěžek 34 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,21 – 8,18 (m, 1H), 7,18 – 7,13 (m, 2H), 6,94 – 6,89 (m, 2H), 5,60 (s, 2H), 3,81 (d, *J* = 0,7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,63, 160,11, 153,17, 150,15, 143,86, 128,89, 125,66, 121,70, 114,79, 55,35, 50,59. ESI-HRMS: *m/z* 309,0299 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 309,0304). Teplota tání 143,2 – 145,0 °C.

**2,6-dichlor-9-(3-methoxybenzyl)-9H-purin (6)**

Bílá pevná látka, výtěžek 52 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,06 (s, 1H), 7,30 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,91 – 6,83 (m, 3H), 5,38 (s, 2H), 3,79 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,17, 153,10, 151,81, 145,53, 138,33, 135,34, 130,60, 130,44, 120,12, 114,16, 113,96, 55,29, 47,93. ESI-HRMS: *m/z* 309,0298 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 309,0304). Teplota tání 121,5 – 126,6 °C.

**2,6-dichlor-7-(3-methoxybenzyl)-7H-purin (14)**

Bílá pevná látka, výtěžek 20 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,24 (s, 1H), 7,32 (t, 1H), 6,91 (dd, 1H), 6,76 – 6,71 (m, 1H), 6,70 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,63 (s, 2H), 3,79 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,62, 160,34, 153,35, 150,33, 143,93, 135,57, 130,62, 121,75, 119,12, 113,93, 113,20, 55,32, 50,80. ESI-HRMS: *m/z* 309,0299 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 309,0304). Teplota tání 112,0 – 117,0 °C.

**2,6-dichlor-9-(naftalen-2-ylmethyl)-9H-purin (7)**

Bílá pevná látka, výtěžek 60 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,10 (s, 1H), 7,89 – 7,81 (m, 3H), 7,78 (s, 1H), 7,56 – 7,52 (m, 2H), 7,38 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 5,58 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,26, 153,22, 151,95, 145,59, 133,22, 133,19, 131,27, 130,69, 129,53, 127,90, 127,83, 127,45, 126,98, 126,96, 125,10, 48,21. ESI-HRMS: *m/z* 329,0346 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 329,0355). Teplota tání 138,7 – 142,5 °C.

**2,6-dichlor-7-(naftalen-2-ylmethyl)-7H-purin (15)**

Bílá pevná látka, výtěžek 11 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,30 (s, 1H), 7,90 – 7,83 (m, 2H), 7,80 – 7,75 (m, 1H), 7,58 – 7,50 (m, 3H), 7,29 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz,

1H), 5,82 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,68, 153,38, 150,48, 143,98, 133,20, 131,48, 129,60, 127,88, 127,84, 127,08, 127,02, 126,42, 126,37, 124,13, 121,83, 51,07. ESI-HRMS: m/z 329,0347 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 329,0355). Teplota tání 139,7 – 144,0 °C.

Pro syntézu následujících dvou následujících látek 2,6-dichlor-9-(1-fenylethyl)-9H-purin (**8**) a 2,6-dichlor-7-(1-fenylethyl)-7H-purin (**16**) byl použit místo derivátů benzylbromidu (1-bromethyl)benzen (0,79 ml, 5,82 mmol).

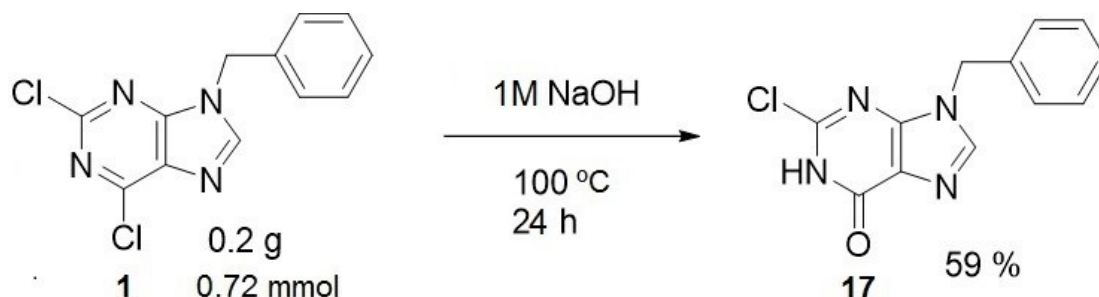
#### 2,6-dichlor-9-(1-fenylethyl)-9H-purin (**8**)

Bílá pevná látka, výtěžek 58 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,06 (s, 1H), 7,43 – 7,33 (m, 5H), 6,03 – 5,89 (m, 1H), 2,02 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze <sup>1</sup>H spektrum. ESI-HRMS: neměřeno, látka se při analýze rozložila. Teplota tání neměřena, látka je polotuhá.

#### 2,6-dichlor-7-(1-fenylethyl)-7H-purin (**16**)

Bílá pevná látka, výtěžek 19 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,33 (s, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 3H), 7,21 – 7,18 (m, 2H), 6,25 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 2,04 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,68, 153,16, 148,14, 143,83, 139,00, 129,38, 128,94, 126,05, 121,53, 57,03, 22,28. ESI-HRMS: neměřeno, látka se při analýze rozložila. Teplota tání neměřena, látka je polotuhá.

#### 2.1.4 SYNTÉZA 9-BENZYL-2-CHLOR-1,9-DIHYDRO-6H-PURIN-6-ONU (**17**) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (**18-24** A **25-32**)



Suspenze 9-benzyl-2,6-dichlor-9H-purinu (**1**; 0,20 g, 0,72 mmol) byla míchána za refluxu ve 20 ml 1M NaOH roztoku NaOH po dobu 24 hodin. Poté byl roztok



neutralizován pomocí 2M HCl na pH 3-4 za vzniku bílé sraženiny. Sraženina byla zfiltrována, promyta vodou a sušena.

**9-benzyl-2-chlor-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (17)**

Bílá pevná látka; 0,11 g; výtěžek 59 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,21 (s, 1H), 7,37 – 7,32 (m, 2H), 7,31 – 7,25 (m, 3H), 5,34 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157,21, 148,18, 141,02, 136,60, 136,35, 128,94, 128,76, 128,07, 127,78, 127,57, 122,79, 46,75. ESI-HRMS: m/z 261,0534 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 261,0538). Teplota tání 235,8 – 240,0 °C.

Analogicky byly připraveny i další deriváty **17-24** a **25-32**.

**7-benzyl-2-chlor-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (25)**

Bílá pevná látka, výtěžek 92 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,42 (s, 1H), 7,34 – 7,32 (m, 5H), 5,53 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 156,76, 154,78, 144,68, 142,32, 137,23, 128,88, 128,10, 127,69, 113,73, 49,43. ESI-HRMS: m/z 261,0535 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 261,0538). Teplota tání 257,0 – 262,2 °C.

**2-chlor-9-(3,4-dichlorbenzyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (18)**

Bílá pevná látka, výtěžek 43 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,21 (s, 1H), 7,64 – 7,58 (m, 2H), 7,23 (dd, *J* = 8,3, 2,1 Hz, 1H), 5,35 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157,68, 148,48, 144,56, 141,18, 137,87, 131,74, 131,43, 131,11, 130,15, 128,35, 123,16, 45,86. ESI-HRMS: m/z 328,9755 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 328,9758). Teplota tání 229,0 – 233,7 °C.

**2-chlor-7-(3,4-dichlorbenzyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (26)**

Bílá pevná látka, výtěžek 90 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,46 (s, 1H), 7,67 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J* = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 5,52 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 156,87, 154,78, 144,73, 142,48, 138,15, 131,35, 131,12, 130,87, 130,07, 128,25, 113,68, 48,29. ESI-HRMS: m/z 328,9752 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 328,9758). Teplota tání 250,1 – 254,7 °C.

**2-chlor-9-(4-isopropylbenzyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (19)**

Bílá pevná látka, výtěžek 54 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,00 (s, 1H), 7,23 – 7,15 (m, 4H), 5,22 (s, 2H), 2,83 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,15 (d,  $J = 6,8$  Hz, 6H),  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  149,20, 148,11, 139,38, 134,57, 127,97, 127,55, 126,77, 126,46, 123,01, 46,15, 33,28, 23,98. ESI-HRMS:  $m/z$  303,1002  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}]^+$  303,1007). Teplota tání 223,6 – 228,3 °C.

**2-chlor-7-(4-isopropylbenzyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (27)**

Bílá pevná látka, výtěžek 95 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,40 (s, 1H), 7,29 – 7,15 (m, 4H), 5,48 (s, 2H), 2,82 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,13 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  156,78, 154,82, 148,35, 144,60, 142,30, 134,68, 127,79, 126,79, 113,69, 49,19, 33,28, 23,94. ESI-HRMS:  $m/z$  303,1002  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}]^+$  303,1007). Teplota tání 239,1 – 243,2 °C.

**2-chlor-9-(4-chlorbenzyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (20)**

Bílá pevná látka, výtěžek 84 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,07 (s, 1H), 7,40 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,28 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 5,29 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  160,09, 148,94, 139,79, 135,98, 132,60, 129,57, 129,46, 128,85, 123,00, 45,80. ESI-HRMS:  $m/z$  295,0147  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}]^+$  295,0148). Teplota tání 208,5 – 212,7 °C.

**2-chlor-7-(4-chlorbenzyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (28)**

Bílá pevná látka, výtěžek 95 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,42 (s, 1H), 7,42 – 7,38 (m, 2H), 7,37 – 7,32 (m, 2H), 5,52 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  156,85, 154,75, 144,67, 142,38, 136,19, 132,79, 129,66, 128,86, 113,70, 48,75. ESI-HRMS:  $m/z$  295,0147  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}]^+$  295,0148). Teplota tání 265,4 – 270,0 °C.

**2-chlor-9-(4-methoxybenzyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (21)**

Bílá pevná látka, výtěžek 85 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,14 (s, 1H), 7,25 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 6,90 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 5,23 (s, 2H), 3,71 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  159,10, 158,23, 148,37, 144,98, 140,50, 129,28, 128,67, 122,84, 114,29, 55,30, 46,24. ESI-HRMS: Při měření se pravděpodobně látka rozložila. Teplota tání 222,8 – 227,1 °C.

**2-chlor-7-(4-methoxybenzyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (29)**

Bílá pevná látka, výtěžek 83 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,40 (s, 1H), 7,32 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,88 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 5,44 (s, 2H), 3,70 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,17, 156,81, 154,82, 144,46, 142,26, 129,45, 129,21, 114,25, 113,60, 55,28, 48,97. ESI-HRMS: Při měření se pravděpodobně látka rozložila. Teplota tání 239,6 – 243,0 °C.

**2-chlor-9-(3-methoxybenzyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (22)**

Bílá pevná látka, výtěžek 74 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,21 (s, 1H), 7,26 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,90 – 6,79 (m, 3H), 5,30 (s, 2H), 3,72 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,65, 159,61, 141,03, 138,07, 130,19, 130,12, 119,63, 119,45, 113,49, 113,46, 113,39, 55,23, 46,69. ESI-HRMS: *m/z* 291,0637 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 291,0643). Teplota tání 213,2 – 217,4 °C.

**2-chlor-7-(3-methoxybenzyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (30)**

Bílá pevná látka, výtěžek 79 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,42 (s, 1H), 7,25 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,96 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,90 – 6,83 (m, 2H), 5,49 (s, 2H), 3,71 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,57, 156,76, 154,80, 144,69, 142,31, 138,68, 130,05, 119,78, 113,70, 113,64, 113,41, 55,21, 49,35. ESI-HRMS: *m/z* 291,0636 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 291,0643). Teplota tání 248,7 – 253,0 °C.

**2-chlor-9-(naftalen-2-ylmethyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (23)**

Bílá pevná látka, výtěžek 63 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,02 (s, 1H), 7,92 – 7,83 (m, 3H), 7,71 (s, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 2H), 7,42 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H). Vzhledem k nízké rozpustnosti, bylo měřeno pouze <sup>1</sup>H spektrum. ESI-HRMS: *m/z* 311,0687 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 311,0694). Teplota tání 210,7 – 214,5 °C.

**2-chlor-7-(naftalen-2-ylmethyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (31)**

Bílá pevná látka, výtěžek 51 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,40 (s, 1H), 7,91 – 7,83 (m, 3H), 7,79 (s, 1H), 7,53 – 7,46 (m, 3H), 5,70 (s, 2H). Vzhledem

k nízké rozpustnosti, bylo měřeno pouze  $^1\text{H}$  spektrum. ESI-HRMS:  $m/z$  311,0687  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}]^+$  311,0694). Teplota tání  $> 300$  °C.

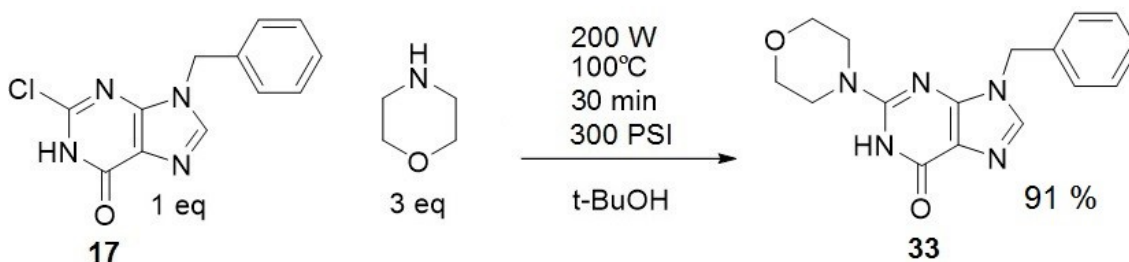
#### 2-chlor-9-(1-fenylethyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (24)

Bílá pevná látka, výtěžek 31 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,38 (s, 1H), 7,38 – 7,25 (m, 5H), 5,76 (q,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 1,90 (d,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  157,25, 147,84, 143,56, 141,19, 139,32, 128,93, 128,02, 126,32, 122,92, 53,86, 20,86. ESI-HRMS:  $m/z$  275,0686  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}]^+$  275,0694). Teplota tání  $> 300$  °C.

#### 2-chlor-7-(1-fenylethyl)-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (32)

Bílá pevná látka, výtěžek 77 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,58 (s, 1H), 7,37 – 7,23 (m, 5H), 6,13 (q,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 1,92 (d,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  156,81, 154,70, 142,67, 142,29, 141,56, 128,85, 128,01, 126,35, 113,64, 56,05, 20,93. ESI-HRMS:  $m/z$  275,0688  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}]^+$  275,0694). Teplota tání  $> 300$  °C.

### 2.1.5 POSTUP PRO PŘÍPRAVU 9-BENZYL-2-MORFOLINO-1,9-DIHYDRO-6H-PURIN-6-ON (33) A ANALOGICKÝCH DERIVÁTŮ (34-40 A 41-48)



9-benzyl-2-chlor-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (**17**; 0,10 g; 0,384 mmol) byl dán do mikrovlnné zkumavky s morfolinem (0,10 ml; 1,15 mmol) a *tert*-butanolem (5 ml). Reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru při teplotě 110 °C, výkonu 200 W, maximálním tlakem 300 psi po dobu 30 min. *Terc*-butanol byl poté odpařen a produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:methanol 30:1.

### **9-benzyl-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (33)**

Bílá pevná látka 0,11 g; výtěžek 91 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,87 (s, 1H), 7,34 – 7,30 (m, 4H), 5,19 (s, 2H), 3,66 – 3,63 (m, 4H), 3,57 – 3,53 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157,58, 152,93, 150,31, 138,30, 137,27, 128,81, 127,99, 127,89, 116,91, 65,71, 46,19, 45,63. ESI-HRMS: m/z 312,1453 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 312,1455). Teplota tání 281,2 – 286,8 °C.

Analogicky byly připraveny i další deriváty **34-40** a **41-48**.

### **7-benzyl-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (41)**

Bílá pevná látka, výtěžek 61 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11,17 (bs, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,34 – 7,29 (m, 5H), 5,45 (s, 2H), 3,65 – 3,62 (m, 4H), 3,48 – 3,45 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,02, 155,44, 152,75, 143,86, 137,85, 128,77, 127,88, 127,57, 108,62, 65,79, 49,16, 49,03, 46,13. ESI-HRMS: m/z 312,1451 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 312,1455). Teplota tání 285,7 – 290,0 °C.

### **9-(3,4-dichlorbenzyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (34)**

Bílá pevná látka, výtěžek 82 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/DMSO-*d*6; 1/1) δ 7,68 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 3,68 – 3,61 (m, 4H), 3,58 – 3,52 (m, 4H). Vzhledem k nízké rozpustnosti bylo měřeno pouze <sup>1</sup>H spektrum. ESI-HRMS: m/z 380,0673 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 380,0676). Teplota tání 321,0 – 324,1 °C.

### **7-(3,4-dichlorbenzyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (42)**

Bílá pevná látka, výtěžek 64 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,20 (s, 1H), 7,65 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,29 (dd, *J* = 8,3, 2,1 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 3,66 – 3,61 (m, 5H), 3,50 – 3,45 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,30, 155,35, 152,79, 143,97, 138,78, 131,24, 131,05, 130,64, 129,96, 128,12, 108,36, 65,78, 48,06, 46,07. ESI-HRMS: m/z 380,0669 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 380,0676). Teplota tání 308,2 - 313,2 °C.

### **9-(4-isopropylbenzyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (35)**

Bílá pevná látka, výtěžek 74 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  11,00 (bs, 1H), 7,86 (s, 1H), 7,26 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,20 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 5,14 (s, 2H), 3,67 – 3,63 (m, 4H), 3,58 – 3,54 (m, 4H), 2,83 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,15 (d,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  157,58, 152,92, 150,26, 148,11, 138,28, 134,73, 128,06, 126,70, 116,91, 65,73, 45,92, 45,64, 33,28, 23,98. ESI-HRMS:  $m/z$  354,1917  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_2]^+$  354,1925). Teplota tání 286,5 – 291,5 °C.

#### **7-(4-isopropylbenzyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (43)**

Bílá pevná látka, výtěžek 86 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  11,18 (bs, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,24 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,18 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 5,40 (s, 2H), 3,66 – 3,60 (m, 4H), 3,48 – 3,43 (m, 4H), 2,83 (p,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 1,14 (d,  $J = 6,9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  159,08, 155,41, 152,74, 148,13, 143,82, 135,31, 127,68, 126,68, 108,60, 65,80, 48,93, 46,15, 33,30, 23,99. ESI-HRMS:  $m/z$  354,1919  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_2]^+$  354,1925). Teplota tání 262,5 – 268,6 °C.

#### **9-(4-chlorbenzyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (36)**

Bílá pevná látka, výtěžek 66 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  10,97 (bs, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,43 – 7,38 (m, 2H), 7,37 – 7,33 (m, 2H), 5,19 (s, 2H), 3,64 (dd,  $J = 5,8, 3,7$  Hz, 4H), 3,55 (dd,  $J = 5,8, 3,9$  Hz, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  157,55, 152,94, 150,28, 138,23, 136,22, 132,55, 129,95, 128,77, 116,92, 65,70, 45,61, 45,51. ESI-HRMS:  $m/z$  346,1064  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_5\text{O}_2]^+$  346,1065). Teplota tání 314,8 – 320,5 °C.

#### **7-(4-chlorbenzyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6H-purin-6-on (44)**

Bílá pevná látka, výtěžek 43 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  8,17 (s, 1H), 7,43 – 7,37 (m, 2H), 7,36 – 7,29 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 3,65 – 3,61 (m, 4H), 3,48 – 3,44 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  159,45, 153,07, 144,19, 144,18, 137,12, 132,85, 129,81, 129,05, 109,99, 66,07, 48,78, 46,40. ESI-HRMS:  $m/z$  346,1064  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_5\text{O}_2]^+$  346,1065). Teplota tání 315,1 – 320,8 °C.

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

Bílá pevná látka, výtěžek 73 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,85 (s, 1H), 7,30 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 5,10 (s, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,67 – 3,64 (m, 4H), 3,59 – 3,55 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 158,99, 157,58, 152,90, 150,19, 138,19, 129,62, 129,26, 116,98, 114,17, 65,74, 55,27, 45,73, 45,67. ESI-HRMS: *m/z* 342,1561 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 342,1561). Teplota tání 284,6 – 287,4 °C.

**7-(4-methoxybenzyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (45)**

Bílá pevná látka, výtěžek 75 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,14 (s, 1H), 7,32 – 7,29 (m, 2H), 6,89 – 6,86 (m, 2H), 5,36 (s, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,65 – 3,61 (m, 5H), 3,48 – 3,44 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,14, 159,04, 155,45, 152,75, 143,67, 129,85, 129,30, 114,15, 108,53, 65,82, 55,27, 48,70, 46,17. ESI-HRMS: *m/z* 342,1560 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 342,1561). Teplota tání 269,7 – 274,1 °C.

**9-(3-methoxybenzyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (38)**

Bílá pevná látka, výtěžek 72 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 7,87 (s, 1H), 7,25 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,96 – 6,93 (m, 1H), 6,90 – 6,79 (m, 2H), 5,15 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,67 – 3,61 (m, 4H), 3,60 – 3,54 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,52, 157,57, 152,90, 150,28, 138,75, 138,31, 129,96, 120,08, 116,88, 113,82, 113,23, 65,71, 55,20, 46,11, 45,61. ESI-HRMS: *m/z* 342,1560 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 342,1561). Teplota tání 271,1 – 274,1 °C.

**7-(3-methoxybenzyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (46)**

Bílá pevná látka, výtěžek 81 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,16 (s, 1H), 7,26 – 7,19 (m, 1H), 6,98 – 6,91 (m, 1H), 6,91 – 6,81 (m, 2H), 5,41 (s, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,67 – 3,60 (m, 4H), 3,52 – 3,43 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,81, 159,38, 155,70, 153,03, 144,21, 139,60, 130,22, 119,99, 113,88, 113,43, 108,88, 66,08, 55,47, 49,38, 46,41. ESI-HRMS: *m/z* 342,1558 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 342,1561). Teplota tání 225,5 – 228,5 °C.

**2-morfolino-9-(naftalen-2-ylmethyl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (39)**

Bílá pevná látka, výtěžek 81 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11,00 (bs, 1H), 8,01 – 7,74 (m, 5H), 7,62 – 7,40 (m, 3H), 5,36 (s, 2H), 3,68 – 3,60 (m, 4H), 3,60 –

3,53 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157,89, 153,19, 150,68, 138,67, 135,02, 133,20, 132,80, 128,80, 128,20, 128,03, 127,08, 126,91, 126,66, 126,36, 66,00, 46,72, 45,93. ESI-HRMS: *m/z* 362,1603 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 362,1612). Teplota tání 304,5 – 309,1 °C.

**2-morfolino-7-(naftalen-2-ylmethyl)-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (47)**

Bílá pevná látka, výtěžek 61 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,23 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,86 – 7,82 (m, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,52 – 7,46 (m, 3H), 5,62 (s, 2H), 3,65 – 3,61 (m, 4H), 3,49 – 3,44 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,42, 155,70, 153,04, 144,30, 135,68, 133,22, 132,83, 128,75, 128,19, 128,02, 126,87, 126,64, 126,52, 125,89, 108,98, 66,08, 49,64, 46,41. ESI-HRMS: *m/z* 362,1603 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 362,1602). Teplota tání 297,4 – 301,9 °C.

**9-(1-fenylethyl)-2-morfolino-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on (40)**

Bílá pevná látka, výtěžek 77 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,02 (s, 1H), 7,39 – 7,22 (m, 5H), 5,64 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,63 (t, *J* = 4,8 Hz, 4H), 3,58 – 3,48 (m, 4H), 1,87 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157,87, 152,94, 150,26, 142,00, 136,88, 129,04, 128,08, 126,89, 117,43, 65,99, 53,36, 45,91, 20,75. ESI-HRMS: *m/z* 326,1603 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 326,1612). Teplota tání 285,8 – 290,8 °C.

**7-(1-fenylethyl)-2-morfolino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on (48)**

Bílá pevná látka, výtěžek 45 %, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 8,31 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,35 – 7,22 (m, 5H), 6,05 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,66 – 3,60 (m, 4H), 3,48 – 3,43 (m, 4H), 1,89 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159,39, 155,56, 152,94, 142,43, 142,08, 128,99, 128,06, 126,55, 108,91, 66,07, 55,81, 46,41, 21,09. ESI-HRMS: *m/z* 326,1603 [M+H]<sup>+</sup> (vypočítáno pro: [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 326,1612). Teplota tání 224,4 – 229,0 °C.



## **2.2 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ**

### **2.2.1 PRŮBĚH A CÍL TESTOVÁNÍ**

Testování probíhalo na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze pod vedením prof. MUDr. Martyň Řezáčové, Ph.D. Cílem bylo analyzovat 16 nově syntetizovaných inhibitorů DNA-PK v kombinaci s doxorubicinem a vyjádřit jejich chemosensibilizující vlastnosti. K hodnocení bylo použito 10 lidských buněčných linií – 9 nádorových a 1 nenádorová buněčná linie.

### **2.2.2 MATERIÁLY A METODY**

Vybrané buněčné linie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a kultivovány dle pokynů poskytovatele. Jednalo se o linie akutní leukémie T-buněk (Jurkat), ovariálního karcinomu (A2780), karcinomu plic (A549), kolorektálního karcinomu (HT-29), adenokarcinomu žaludku (AGS), epiteloidního karcinomu slinivky (PANC-1), adenokarcinomu cervixu (HeLa), adenokarcinomu prsu (MCF-7), osteosarkomu (SAOS-2) a plicního fibroblastu (MRC-5).

Každá buněčná linie byla naočkována dle optimální hustoty (30 až  $500 \times 10^3$  buněk na jamku) na 96 jamkové destičky a byla kultivována přes noc. Inhibitory byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na zásobní roztoky o koncentraci 10 mmol/l. Během testování byl zásobní roztok zředěn kompletním kultivačním médiem na koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ . Buňky byly vystaveny koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  inhibitoru samostatně nebo v kombinaci s doxorubicinem po dobu 48 hodin. Koncentrace doxorubicinu byla stanovena dle  $\text{IC}_{50}$  pro každou buněčnou linii a pohybovala v rozmezí od 0,05 – 1,00  $\mu\text{mol/l}$ . Nejnižší koncentraci doxorubicinu 0,05  $\mu\text{mol/l}$  byly vystaveny linie Jurkat a A2780. Pro buněčné linie A549, AGS a HeLa byla použita koncentrace 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , pro HT-29, SAOS-2, MCF-7, MRC-5 koncentrace 0,5  $\mu\text{mol/l}$  a nejvyšší koncentrace 1  $\mu\text{mol/l}$  byla použita pro linii PANC-1. Buňky také byly vystaveny působení standardních inhibitorů DNA-PK – NU7441 a NU7026 v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$  v daném pořadí a vlivu ATM inhibitoru KU55933 v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ . Maximální koncentrace DMSO v kultivačním médiu byla 0,1 %.

Reakční činidlo WST-1 (Roche, Mannheim, Německo) bylo použito pro stanovení cytotoxického účinku testovaných sloučenin. Na konci kultivačního období byl

proveden test dle protokolu výrobce. Absorbance byla měřena na spektrometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko). Každá hodnota je průměr ze tří nezávislých měření a představuje procento kontrolní proliferace neošetřených buněk (100 %). Hodnota procent růstu (GP, z anglického growth percent) byla vypočtena pro každý testovaný inhibitor. GP představuje průměr poklesu životaschopnosti všech 10 buněčných linií, které byly ošetřeny stejným inhibitorem. GP se uvádí v procentech.

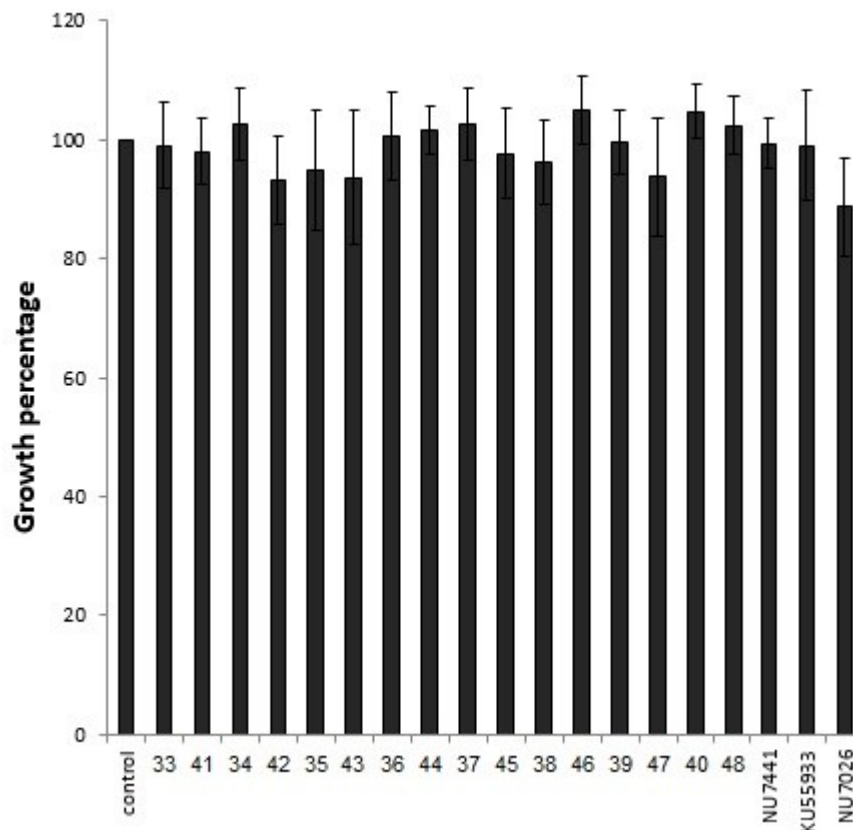
### **2.2.3 VÝSLEDKY**

V rámci této diplomové práce byly hodnoceny deriváty **33-48**.

#### **2.2.3.1 ANTIPROLIFERATIVNÍ PŮSOBNÍ**

Nejprve byl testován inhibiční účinek každé sloučeniny zvlášť, kdy inhibitory v koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  působily na 10 buněčných linií. Do hodnocení byly zahrnuty i standardní inhibitory DNA-PK – NU7441 (1  $\mu\text{mol/l}$ ), NU7026 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a ATM inhibitor KU55933 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Doxorubicin v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  sloužil jako pozitivní kontrola.

Buněčné linie byly vystaveny působení inhibitorů 48 hodin a poté byla testována jejich životaschopnost. Proliferace buněk byla stanovena pomocí WST-1 testu proliferace a vztahuje se k proliferaci neošetřených kontrolních buněk (100 %). Výsledky (Obr. 13) ukázaly, že inhibitory nevykazovaly významnou inhibici proliferace a procento životaschopných buněk se pohybovalo od 73 – 121 %. Kompletní údaje jsou uvedeny v Tabulce 1 v Příloze.

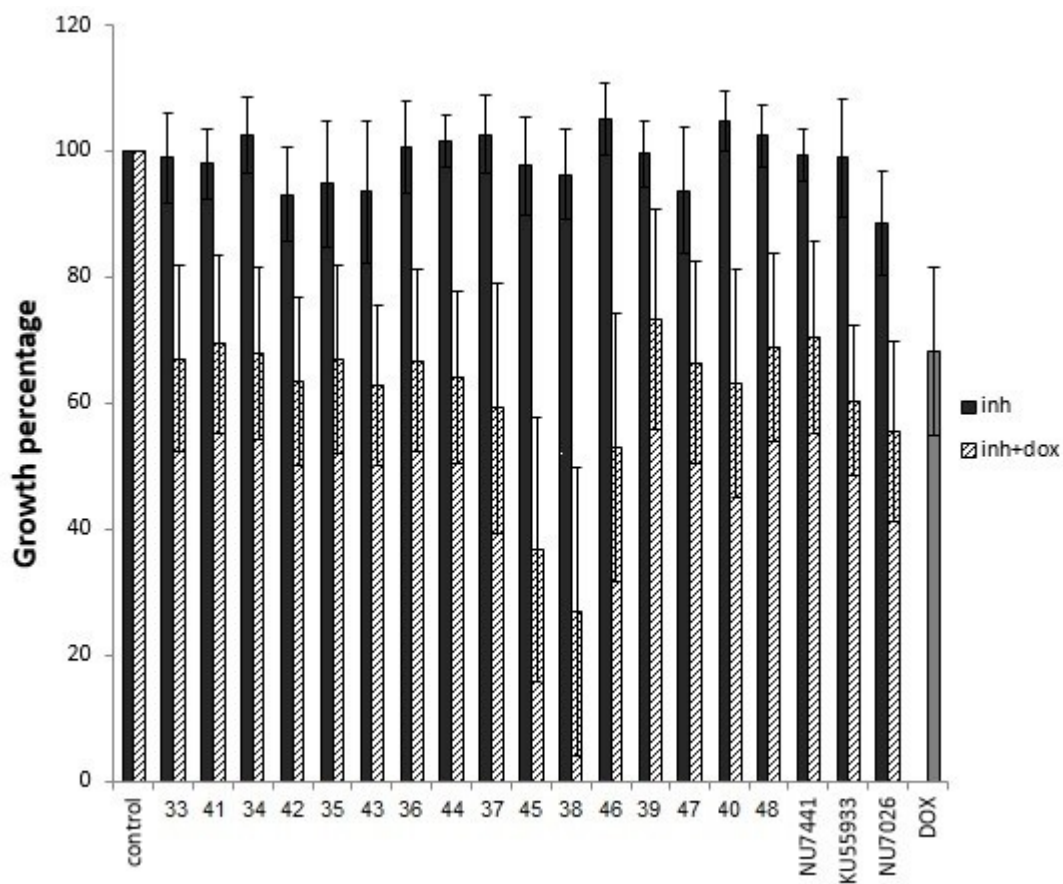


**Obrázek 12.** Graf zobrazující průměry GP samotných inhibitorů.

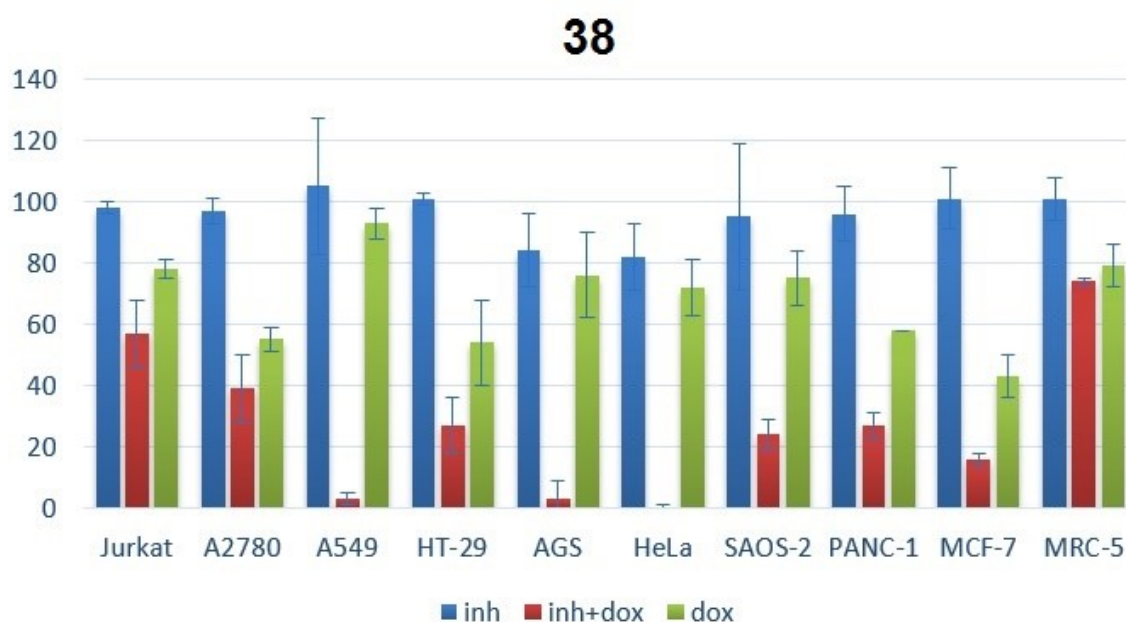
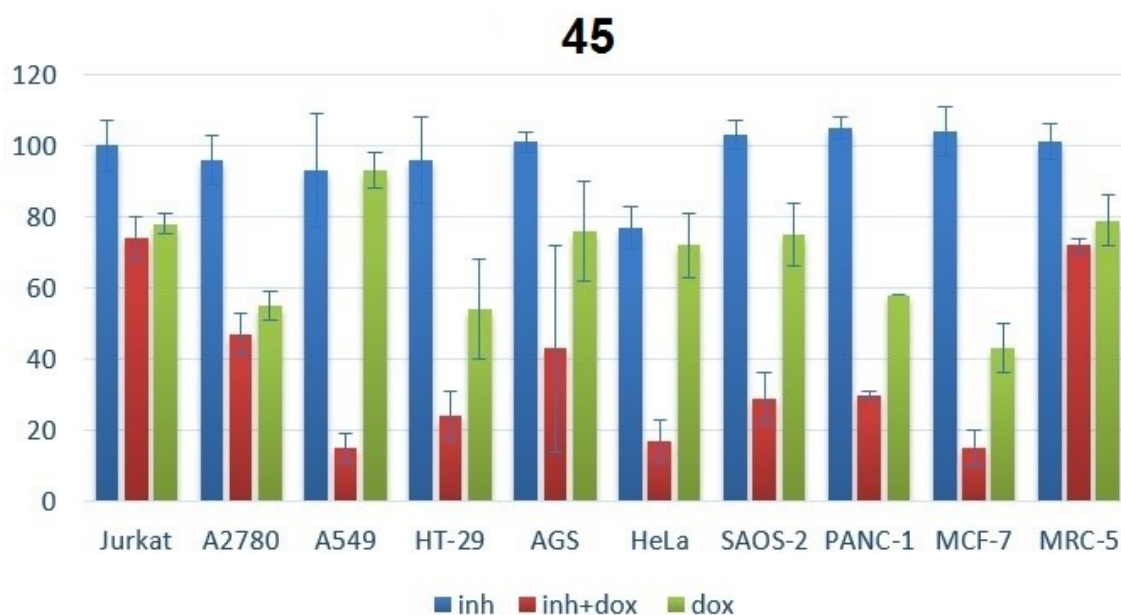
### 2.2.3.2 CHEMOSENSIBILIZACE

Dále byla testována chemosensibilizace jednotlivých látek. Hodnocení opět probíhalo na 10 lidských buněčných liniích, na které inhibitory působily v kombinaci s vhodnými dávkami doxorubicinu.

Pro vyjádření celkové inhibiční aktivity každého inhibitoru byla vypočtena hodnota GP. Významný chemosensibilizující účinek byl prokázán u 2 testovaných inhibitorů v 7 testovaných rakovinných liniích. Výsledky jsou zobrazeny v následujícím grafu (Obr. 14). Nejúčinnější byly sloučeniny **45** a **38** s hodnotami GP 37 % a 27 % (Obr. 15). Nejcitlivější buněčné linie byly A549, HT-29, AGS, HeLa, SAOS-2, PANC-1 a MCF-7. Chemosensibilizující efekt nebyl pozorován u linie Jurkat, A2780 a MRC-5. Neaktivita u nenádorové linie MRC-5 je pro nás velmi žádoucí s ohledem na toxicitu v potenciální terapii. Kompletní údaje jsou uvedeny v Tabulce 2 v Příloze.



**Obrázek 13.** Graf zobrazující chemosensibilizující účinek inhibitorů v kombinaci s doxorubicinem. Hodnota GP byla vypočítána pro každý inhibitor, stejně tak pro kombinaci s doxorubicinem.



**Obrázek 14.** Znázornění životaschopnosti 10 buněčných linií po inkubaci s inhibitory **45** a **38** a jejich kombinaci s doxorubicinem. Koncentrace doxorubicinu byla vybrána individuálně pro každou buněčnou linii v souladu s její citlivostí. Hodnoty byly vypočteny jako průměr ze tří nezávislých měření a jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti neošetřených kontrolních buněk (100 %).

### 3 DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo připravit sérii nových purinových derivátů vycházejících ze základního inhibitoru LY294002. Stejný heterocyklus je součástí kofeinu, který má mimo stimulačního účinku i vliv na opravu buněčného cyklu a DNA v důsledku inhibice ATM a ATR kinas.<sup>61</sup>

Celkem bylo připraveno 8 dvojic derivátů, přičemž jednotlivé aromatické substituenty byly vybírány, aby byla zajištěna určitá rozmanitost funkčních skupin. Tříkroková syntéza vycházela z 2,6-dichlorpurinu, ke kterému byly připojeny různé aromatické substituenty a jednotlivá analoga byla oddělena sloupcovou chromatografií. Syntéza v prvním kroku probíhala preferenčně do polohy 9-, tento analog byl tedy majoritní a z kolony eluován jako první. Ve druhém kroku došlo k hydrolyze působením hydroxidu sodného a v závěrečné části syntézy byl pomocí mikrovlnného záření připojen morfolin. Benzylace a připojení morfolinu probíhalo s vysokými výtěžky (> 85 %). Výtěžky druhé, hydrolytické reakce byly vesměs závislé na rozpustnosti látek ve vodě, některé deriváty se špatně rozpouštěly v 1M NaOH a tím se výtěžek snižoval.

První část biologického testování byla zaměřena na účinek samostatných inhibitorů na buňky. Podle očekávání testované deriváty nevykazovaly významnou inhibici buněčné proliferace, ani neměly cytotoxický účinek. Ve druhé fázi se hodnotil vliv jednotlivých derivátů na proces chemosensibilizace v kombinaci s doxorubicinem. Doxorubicin byl použit v různých koncentracích v závislosti na sensitivitě daných buněčných linií k tomuto cytostatiku. Nejúčinnější byly sloučeniny **45** a **38**, přičemž derivát **38** dokázal v kombinaci s doxorubicinem snížit procento životaschopných buněk u tří nádorových linií (HeLa, A549 a AGS) téměř na nulu. Velmi citlivé byly rovněž linie SAOS-2 a MCF-7. U derivátu **45** byly taktéž zasaženy linie MCF-7, A549, HeLa a linie kolorektálního karcinomu HT-29. Buněčná linie MCF-7 byla citlivá také vůči působení derivátů **37** a **46**.

Velmi pozitivní je neaktivita derivátů v plicním fibroblastu MRC-5. Použití inhibitorů u této buněčné linie téměř nijak neovlivnilo účinek doxorubicinu. Příčinou mohou být narušené signální dráhy DDR nádorových buněk, např. mutace p53 či ATM, které činí nádorové buňky citlivější k dalším zásahům. Naproti tomu u zdravých buněk, jako v případě MRC-5, může jednu vyřazenou signální dráhu

nahradit druhá. V našem případě vyřazení DNA oprav pomocí NHEJ inhibicí DNA-PK může být nahrazeno kinasou ATM a opravou pomocí HR.

Je zajímavé, že deriváty **45** a **38** se vzájemně liší polohou aromatického substituentu. Zatímco nejúčinnější derivát **38** má methoxyfenyl napojený přes methylenový můstek v poloze 9-, tak derivát **45** v poloze 7-. Vysokou účinnost od látek v poloze 7- jsme nečekali, neboť při studiu inhibitorů DNA-PK, které obsahovaly aromatický substituent v jiných polohách, došlo vždy ke snížení účinnosti.<sup>55</sup> Látky **45** a **38** se liší také polohou methoxy skupiny, která se u derivátu **38** nachází v poloze 3- a u **45** v poloze 4-. Domníváme se, že pro účinek není důležité, zda se methoxy skupina nachází v poloze 3- nebo 4-. Účinnost na buněčnou linii MCF-7 totiž vykazovaly i další deriváty s methoxy skupinou **37** a **46**.

Finální deriváty byly testovány v porovnání se standardními inhibitory DNA-PK – NU7441 (1  $\mu\text{mol/l}$ ), NU7026 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a ATM inhibitorem KU55933 (10  $\mu\text{mol/l}$ ). NU7441 byl použit v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  v důsledku jeho nízké rozpustnosti. Nicméně i v této koncentraci by měl působit dobře, což se bohužel nestalo. Nové deriváty jsou účinnější než NU7026, který působí dle literatury 10× slaběji než NU7441.<sup>55</sup> Bohužel ale nemůžeme naše látky přímo porovnat s látkou NU7441, která se používá jako hlavní standard při posuzování inhibice DNA-PK a chemosensibilizace.

Je ovšem nutné dodat, že inhibicí DNA-PK si u našich látek zatím nemůže být jisti. Nad inhibicí DNA-PK uvažujeme jen podle účinku chemosensibilizace a struktur připravených derivátů. Inhibice příbuzných kinas ATM a ATR je méně pravděpodobná a v současné době probíhá testování inhibice Chk1 a Chk2, jakožto přímých cílů ATM a ATR kinas, které odhalí, zda jsou tyto kinasy ovlivněny. V budoucnu je naplánované další detailnější testování nejúčinnějších derivátů. Především stanovení inhibice DNA-PK i PI3K, testování radiosensibilizace i použití jiných cytotoxických agens.

## 4 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo připraveno 16 nových purinových derivátů jako potenciálních inhibitorů DNA-PK. *In vitro* byla stanovena jejich schopnost vyvolat chemosensibilizaci v kombinaci s doxorubicinem. Dva z připravených derivátů **38** a **45** vykazovaly velmi výrazný chemosensibilizující efekt na 7 buněčných nádorových linií a mohou mít tedy terapeutický potenciál pro léčbu pacientů s rakovinou.



## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Khanna, A. DNA damage in cancer therapeutics: a boon or a curse? *Cancer Res.*, **2015**, 75(11), 2133–2138.
- (2) Mitra, A. K.; Agrahari, V.; Mandal, A.; Cholkar, K.; Natarajan, C.; Shah, S.; Joseph, M.; Trinh, H. M.; Vaishya, R.; Yang, X.; Hao, Y.; Khurana, V.; Pal, D. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. *J. Control. Release*, **2015**, 219, 248–268.
- (3) Mačák, J.; Mačáková, J. *Patologie*. 2. vyd., Grada Publ., Praha 2012. ISBN: 978-80-247-3530-6.
- (4) Stříteský, J. *Patologie: Učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd., Epava, Olomouc 2001. ISBN: 978-80-86297-06-4.
- (5) Žaloudík, J. *Vyhňte se rakovině: aneb prevence zhoubných nádorů pro každého*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2008. ISBN: 978-80-247-2307-5.
- (6) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016 [online], [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html>
- (7) Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Zdraví 2020: Národní strategie ochrany a podpory zdraví a prevence nemocí [online], [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/verejne/dokumenty/zdravi-2020-narodni-strategie-ochrany-a-podpory-zdravi-a-prevence-nemoci\\_8690\\_3016\\_5.html](http://www.mzcr.cz/verejne/dokumenty/zdravi-2020-narodni-strategie-ochrany-a-podpory-zdravi-a-prevence-nemoci_8690_3016_5.html)
- (8) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017 [online], [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>
- (9) Wei, E. K.; Wolin, K. Y.; Colditz, G. A. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. *J. Clin. Oncol.*, **2010**, 28, 4052–4057.
- (10) Schiffman, J. D.; Fisher, P. G.; Gibbs, P. Early detection of cancer: past, present, and future. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book*, **2015**, 35, 57–65.
- (11) Zavoral, M.; Suchánek, Š.; Vepřeková, G.; Májek, O.; Jakub, G.; Dušek, L. Screening a včasný záchyt kolorektálního karcinomu: současný stav v jednotlivých krajích České republiky. *Onkologie*, **2011**, 5 (4), 210–214.
- (12) Chovanec, J.; Dostálová, Z.; Navrátilová, J. Karcinom prsu: aktuální problém. *Interni Med. Praxi*, **2008**, 10 (2), 84–89.

- (13) Becker, H. D. *Chirurgická onkologie*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2005. ISBN 80-247-0720-9.
- (14) Alberts, B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd., Espero, Ústí nad Labem 2001. ISBN: 80-902906-2-0.
- (15) 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/>
- (16) Silbernagl, S.; Lang, F. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2001. ISBN: 80-7169-968-3.
- (17) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**, *144* (5), 646–674.
- (18) Klener, P. *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2013. ISBN: 978-80-247-4171-0.
- (19) Klener, P. Omezilo zavádění tzv. cílené léčby význam protinádorové chemoterapie? *Onkologie*, **2008**, *2* (1), 33–37.
- (20) Svoboda, J.; Syslová, K.; Kačer, P. Cílený transport platinových cytostatik. *Chem. Listy*, **2016**, *110* (12), 909–916.
- (21) Hartl, J.; Doležal M.; Miletín M.; Opletalová V.; Zimčík P. *Farmaceutická chemie IV*. 2. vyd., Karolinum, Praha 2012. ISBN: 978-80-246-2129-6.
- (22) Goněc, R.; Kozáková, Š. Cílená léčba versus klasická cytostatika. *Onkologie*, **2014**, *8* (5), 231–233.
- (23) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd., Grada Publ., Praha 2004. ISBN: 80-247-0836-124.
- (24) Martínková, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2007. ISBN: 978-80-247-1356-4.
- (25) Fu, D.; Calvo, J. A.; Samson, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, *12* (2), 104–120.
- (26) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Wirth, J.; Wenke, M. *Barevný atlas farmakologie*. 4. vyd., Grada Publ., Praha 2012. ISBN: 978-80-247-3908-3.
- (27) Sawyer, D. B.; Peng, X.; Chen, B.; Pentassuglia, L.; Lim, C. C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection? *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **2010**, *53* (2), 105–113.

- (28) Klener, P.; Klener, P. Jr. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2010. ISBN: 978-80-247-2808-7.
- (29) Xu, Y.; Her, C. Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy. *Biomolecules*, **2015**, *5* (3), 1652–1670.
- (30) Lee, C.-T.; Huang, Y.-W.; Yang, C.-H.; Huang, K.-S. Drug delivery systems and combination therapy by using Vinca alkaloids. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2015**, *15* (15), 1491–1500.
- (31) Binder, S. Evolution of taxanes in the treatment of metastatic breast cancer. *Clin. J. Oncol. Nurs.*, **2013**, *17* Suppl., 9–14.
- (32) Fauzee, N. J. S. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2011**, *12* (4), 837–851.
- (33) Mechl, Z.; Brančíková, D. Nežádoucí účinky protinádorové léčby a jejich léčba. *Med. Praxi*, **2009**, *6* (6), 325–329.
- (34) Joo, W. D.; Visintin, I.; Mor, G. Targeted cancer therapy: are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas*, **2013**, *76* (4), 308–314.
- (35) Røslund, G. V.; Engelsen, A. S. T. Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2015**, *116* (1), 9–18.
- (36) Hait, W. N.; Hambley, T. W. Targeted cancer therapeutics. *Cancer Res.*, **2009**, *69* (4), 1263–1267.
- (37) Cwierka, K.; Hajdúch, M.; Trojanec, R.; Špačková, K. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin. Farmakol. Farm.*, **2004**, *18* (3), 165–170.
- (38) Vorlíček, J.; Abrahámová, J.; Vorlíčková, H. a kol. *Klinická onkologie pro sestry*. 2. přepracované a doplněné vyd., Grada Publ., Praha 2012. ISBN: 978-80-247-3742-3.
- (39) Matesic, D.; Ali, A.; Sidorova, T.; Burns, T. A. Cell-cell communication marker for identifying targeted tumor therapies. *Curr. Bioact. Compd.*, **2014**, *9* (3), 255–262.
- (40) Qiu, Y.-Q.; Zhou, J.; Kang, X.-S.; Shen-Tu, J.-Z.; Ding, L.-M.; Tan, F.-L.; Guo, J.; Li, L.-J. Discovery of potent, orally active compounds of tyrosine kinase and serine/threonine-protein kinase inhibitor with anti-tumor activity in preclinical assays. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **2012**, *9* (3), 431–439.

- (41) Radha, V.; Nambirajan, S.; Swarup, G. Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *236* (2), 352–359.
- (42) Lemmon, M. A.; Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **2010**, *141* (7), 1117–1134.
- (43) Zhang, Y.; Opresko, L.; Shankaran, H.; Chrisler, W. B.; Wiley, H. S.; Resat, H. HER/ErbB receptor interactions and signaling patterns in human mammary epithelial cells. *BMC Cell Biol.* [online], **2009**, *10*:78. [cit. 2017-04-14].  
Dostupné z: <https://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-10-78>
- (44) Rusnak, D. W.; Affleck, K.; Cockerill, S. G.; Stubberfield, C.; Harris, R.; Page, M.; Smith, K. J.; Guntrip, S. B.; Carter, M. C.; Shaw, R. J.; Jowett, A.; Stables, J.; Topley, P.; Wood, E. R.; Brignola, P. S.; Kadwell, S. H.; Reep, B. R.; Mullin, R. J.; Alligood, K. J.; Keith, B. R.; Crosby, R. M.; Murray, D. M.; Knight, W. B.; Gilmer, T. M.; Lackey, K. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.*, **2001**, *61* (19), 7196–7203.
- (45) Howe, L. R.; Brown, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, **2011**, *4* (8), 1149–1157.
- (46) Taeger, J.; Moser, C.; Hellerbrand, C.; Mycielska, M. E.; Glockzin, G.; Schlitt, H. J.; Geissler, E. K.; Stoeltzing, O.; Lang, S. A. Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2011**, *10* (11), 2157–2167.
- (47) Shibuya, M. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* [online], **2013**, *5* (10): a009092. [cit. 2017-04-14].  
Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/10/a009092.long>
- (48) Colicelli, J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci. Signal.* [online], **2010**, *3* (139):re6. [cit. 2017-04-14].  
Dostupné z: <http://stke.sciencemag.org/content/3/139/re6.long>
- (49) An, X.; Tiwari, A. K.; Sun, Y.; Ding, P.-R.; Ashby, C. R.; Chen, Z.-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome

- positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk. Res.*, **2010**, *34* (10), 1255–1268.
- (50) Krška, Z.; Hoskovec, D.; Petruželka, L. *Chirurgická onkologie*. 1. vyd., Grada Publ., Praha 2014. ISBN: 978-80-247-4284-7.
- (51) Emens, L. A. Chemoimmunotherapy. *Cancer J.*, **2010**, *16* (4), 295–303.
- (52) Sui, X.; Chen, R.; Wang, Z.; Huang, Z.; Kong, N.; Zhang, M.; Han, W.; Lou, F.; Yang, J.; Zhang, Q.; Wang, X.; He, C.; Pan, H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* [online], **2013**, *4* (10): e838. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n10/full/cddis2013350a.html>
- (53) Jackson, S. P.; Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **2009**, *461* (7267), 1071–1078.
- (54) Andrs, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Hodny, Z.; Kuca, K. Small molecules targeting ataxia telangiectasia and Rad3-Related (ATR) kinase: an emerging way to enhance existing cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2016**, *16* (3), 200–208.
- (55) Andrs, M.; Korabecny, J.; Jun, D.; Hodny, Z.; Bartek, J.; Kuca, K. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: importance of the morpholine ring. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58* (1), 41–71.
- (56) Lavin, M. F. ATM: The product of the gene mutated in ataxia-telangiectasia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1999**, *31* (7), 735–740.
- (57) Hill, R.; Lee, P. W. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): more than just a case of making ends meet? *Cell Cycle*, **2010**, *9* (17), 3460–3469.
- (58) Sibanda, B. L.; Chirgadze, D. Y.; Blundell, T. L. Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature*, **2010**, *463* (7277), 118–121.
- (59) Furgason, J. M.; Bahassi, E. M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol. Ther.*, **2013**, *137* (3), 298–308.
- (60) Vlahos, C. J.; Matter, W. F.; Hui, K. Y.; Brown, R. F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269* (7), 5241–5248.
- (61) Andrs, M.; Muthna, D.; Rezacova, M.; Seifrtova, M.; Siman, P.; Korabecny, J.; Benek, O.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. Novel caffeine

- derivatives with antiproliferative activity. *RSC Adv.*, **2016**, 6 (39), 32534–32539.
- (62) Davidson, D.; Amrein, L.; Panasci, L.; Aloyz, R. Small molecules, inhibitors of DNA-PK, targeting DNA repair, and beyond. *Front. Pharmacol.* [online], **2013**, 4:5. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00005/full>
- (63) Study of CC-122 to evaluate the safety, tolerability, and effectiveness for patients with advanced solid tumors, non-Hodgkin's lymphoma, or multiple myeloma; ClinicalTrials.gov.Identifier: NCT01421524 [online], [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01421524>
- (64) Phase 1 trial of MSC2490484A, an inhibitor of a DNA-dependent protein kinase, in combination with radiotherapy; ClinicalTrials.gov.Identifier: NCT02516813 [online], [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02516813>
- (65) Golding, S. E.; Rosenberg, E.; Valerie, N.; Hussaini, I.; Frigerio, M.; Cockcroft, X. F.; Chong, W. Y.; Hummersone, M.; Rigoreau, L.; Menear, K. A.; O'Connor, M. J.; Povirk, L. F.; van Meter, T.; Valerie, K. 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 (10), 2894–2902.

## 6 PŘÍLOHY

**Tabulka 1** Data působení samotných inhibitorů

	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>
<b>Jurkat</b>	91	107	96	94	96	98	94	99	91	90
<b>A2780</b>	100	102	96	105	96	97	103	108	103	91
<b>A549</b>	104	93	99	108	106	105	96	113	103	107
<b>HT-29</b>	113	116	109	111	117	101	107	110	101	102
<b>AGS</b>	100	107	98	103	100	84	88	102	92	92
<b>HeLa</b>	86	100	86	91	97	82	99	98	90	87
<b>SAOS-2</b>	96	102	91	97	103	95	100	102	102	98
<b>PANC-1</b>	100	96	73	92	98	96	105	105	92	79
<b>MCF-7</b>	97	99	108	110	106	101	100	105	104	93
<b>MRC-5</b>	104	106	93	95	106	101	105	107	102	93
<b>průměr</b>	99	103	95	101	103	96	100	105	98	93
<b>SD</b>	7,1308	6,1111	10,0033	7,3451	6,1000	7,1506	5,3464	4,6585	5,5060	7,4599

	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>NU7441</b>	<b>KU55933</b>	<b>NU7026</b>
<b>Jurkat</b>	79	95	100	101	73	95	99	77	86
<b>A2780</b>	85	100	96	104	79	103	94	94	77
<b>A549</b>	103	110	93	104	99	99	103	98	79
<b>HT-29</b>	118	104	96	121	110	112	104	99	93
<b>AGS</b>	88	98	101	100	94	101	92	95	88
<b>HeLa</b>	85	97	77	102	97	99	105	106	95
<b>SAOS-2</b>	94	102	103	102	96	99	97	98	93
<b>PANC-1</b>	85	102	105	104	91	104	103	114	103
<b>MCF-7</b>	104	106	104	103	97	110	96	106	78
<b>MRC-5</b>	95	103	101	108	100	101	101	103	94
<b>průměr</b>	94	102	98	105	94	102	99	99	89
<b>SD</b>	11,2825	4,1440	7,6599	5,7595	10,0319	4,9076	4,1834	9,2452	8,2339

**Tabulka 2** Data působení inhibitorů v kombinaci s doxorubicinem.

	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>
<b>Jurkat</b>	71	80	69	72	74	57	68
<b>A2780</b>	48	49	47	47	54	39	51
<b>A549</b>	89	98	101	92	89	3	105
<b>HT-29</b>	54	55	57	64	43	27	72
<b>AGS</b>	62	70	71	49	65	3	69
<b>HeLa</b>	78	72	76	76	65	0	74
<b>SAOS-2</b>	72	61	59	67	58	24	75
<b>PANC-1</b>	58	60	60	62	44	27	66
<b>MCF-7</b>	48	59	53	52	18	16	50
<b>MRC-5</b>	90	76	78	88	83	74	104
<b>průměr</b>	67	68	67	67	59	27	73
<b>SD</b>	14,8833	13,7737	14,8510	14,4950	19,9652	22,9162	17,5395

	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>
<b>Jurkat</b>	70	72	62	63	75	74	68
<b>A2780</b>	52	49	44	43	49	47	49
<b>A549</b>	92	101	96	85	77	15	81
<b>HT-29</b>	54	63	63	63	59	24	37
<b>AGS</b>	41	67	63	54	49	43	37
<b>HeLa</b>	68	66	68	66	69	17	54
<b>SAOS-2</b>	70	71	55	64	71	29	63
<b>PANC-1</b>	56	61	59	56	59	30	40
<b>MCF-7</b>	36	56	51	50	45	15	13
<b>MRC-5</b>	93	86	71	84	89	72	86
<b>průměr</b>	63	69	63	63	64	37	53
<b>SD</b>	18,1814	14,1788	13,3532	12,6958	13,7016	20,8850	21,2426



	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>NU7441</b>	<b>KU55933</b>	<b>NU7026</b>	<b>DOX</b>
<b>Jurkat</b>	57	70	69	58	70	78
<b>A2780</b>	44	49	55	65	44	55
<b>A549</b>	105	99	81	75	58	93
<b>HT-29</b>	65	68	64	63	66	54
<b>AGS</b>	57	63	82	85	57	76
<b>HeLa</b>	76	67	83	59	63	72
<b>SAOS-2</b>	73	73	80	56	58	75
<b>PANC-1</b>	57	55	63	37	43	58
<b>MCF-7</b>	56	54	48	37	26	43
<b>MRC-5</b>	75	90	79	68	70	79
<b>průměr</b>	66	69	70	60	56	68
<b>SD</b>	16,1697	14,9289	15,1656	11,9040	14,3338	13,3273