

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Syntéza purinových derivátů obsahujících v
poloze N⁷ *terc*-butylovou skupinu**

Bakalářská práce

Autor:

Filip Nevrka

Studijní program:

B1407 Chemie

Studijní obor:

Chemie – Biologie

Typ studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jakuba Stýskaly, Ph.D a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, 7.5.2021

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych velice poděkoval svému skvělému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Jakobovi Stýskalovi, PhD. za veškerý čas, který mi věnoval a za cenné zkušenosti v laboratorní praxi, které mě naučil. Dále za důvěru a možnost samostatné práce v laboratoři, za skvělé vedení práce, čehož si velmi vážím. Také bych chtěl poděkovat celému kolektivu Katedry organické chemie za příjemné pracovní prostředí. Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2021_024).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Filip Nevrlka
Název práce:	Syntéza purinových derivátů obsahující v poloze N ⁷ <i>tert</i> -butylovou skupinu
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D
Rok obhajoby práce:	2021
Abstrakt:	<p>Cílem této bakalářské práce bylo připravit 6-substituované deriváty purinu s <i>tert</i>-butylovým zbytkem v poloze N⁷ purinu a výsledné sloučeniny otestovat na biologickou aktivitu.</p> <p>Teoretická část bakalářské práce je rozdělena na 2 části. První část je věnována stručně chemii a biochemii 2,6,9-trisubstituovaným purinům a charakteristikou cyklin dependentních kináz. Druhá část je zaměřena na obecné metody přípravy N⁷-substituovaných purinů.</p> <p>Vlastní část práce se věnuje otestování metod popsanych v literatuře pro zavedení substituentů do polohy N⁷. Dále se věnuje nalezení a propracování metody, která umožňuje zavedení <i>tert</i>-butylu do polohy N⁷, jelikož takové sloučeniny nebyly v literatuře doposud popsány.</p>
Klíčová slova:	Cyklin dependentní kinázy, <i>tert</i> -butyl, 7-(<i>tert</i> -butyl)-6-chlorpurin, silylační metoda
Počet stran:	100
Počet příloh:	18
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Filip Nevrlka

Title: Synthesis of purine derivatives containing a *tert*-butyl group in the N⁷ position

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D

The year of presentation: 2021

Abstract: The aim of this bachelor thesis was to prepare 6-substituted purine derivatives with a *tert*-butyl residue in the N⁷ position and to test the resulting compounds for biological activity.

The theoretical part of the bachelor thesis is divided into 2 parts. The first part is briefly devoted to the chemistry and biochemistry of 2,6,9-trisubstituted purines and the characteristics of cyclin dependent kinases. The second part focuses on general methods for the preparation of N⁷-substituted purines.

The own part is devoted to testing the methods described in the literature for the introduction of substituents in the N⁷ position. It is further devoted to finding and elaborating a method which allows the introduction of *tert*-butyl into the N⁷ position, since such compounds have not been described in the literature so far.

Keywords: Cyclin dependent kinases, *tert*-butyl, 7-(*tert*-butyl)-6-chloropurine, silylation method

Number of pages: 100

Number of attachments: 18

Language: Czech

Seznam zkratk:

6-CIP	6-chlorpurin
ACN	acetonitril
Bn	benzyl
BnBr	benzylbromid
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl-dikarbonát
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
CDK	Cyklin-dependentní kináza
DCE	1,2-dichlorethan
DCM	dichlormethan
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
LiHMDS	lithium bis(trimethylsilyl)amid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TMSOTf	trimethylsilylester trifluormethansulfonové kyseliny
Tr	trityl
TrCl	tritylchlorid
Ti(<i>i</i> PrO) ₄	isopropoxid titaničitý
<i>t</i> -BuBr	<i>tert</i> -butylbromid

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	12
2.1	Charakteristika CDK a 2,6,9-trisubstituované purinové inhibitory	12
2.1.1	Cyklin dependentní kináza.....	12
2.1.2	Klasifikace cyklin dependentních kináz.....	14
2.1.3	Inhibitory s purinovým skeletem	15
2.1.4	Vztah buněčného cyklu s cyklin dependentními kinázami	17
2.1.5	Buněčné účinky 2,6,9 - trisubstituovaných purinů.....	17
2.1.6	Syntetický přístup k 2,6,9-trisubstituovaným purinům.....	18
2.2	Syntetický přístup k 7-substituovaným purinům	21
2.2.1	Metoda přímé alkylace	21
2.2.2	Příprava přes N ⁹ chráněné 7,8-dihydropuriny.....	22
2.2.3	Alkylace purinů za použití Grignardových činidel	23
2.2.4	Cyklizační metody vedoucí k přípravě 7-substituovaných purinů.....	24
2.2.5	Silylační metoda.....	27
2.2.6	Příprava 7-substituovaných purinů alkyací přes puriniové soli	29
3	Výsledky a diskuse.....	31
3.1	Aplikace metod popsaných v literatuře pro přípravu N ⁷ substituovaných purinů k zavedení terciárního zbytku.....	31
3.1.1	Metoda umožňující přípravu přes 7,8-dihydropurin chráněný v poloze N ⁹ -Boc skupinou.....	31
3.1.2	Alkylační metoda s využitím Grignardového činidla	34
3.1.3	Metoda přímé alkylace	36
3.1.4	Příprava 7-substituovaných purinů alkyací přes puriniové soli	37
3.1.5	Silylační metoda.....	38
3.2	Identifikace struktury 7-(<i>terc</i> -butyl)-6-chlorpurinu (9)	47
3.3	Stabilita připraveného 7-(<i>terc</i> -butyl)-6-chlorpurinu (9).....	48

3.3.1	Testování stability sloučeniny 9.....	48
3.4	Využití 7-(<i>terc</i> -butyl)-6-chlorpurinu k přípravě dalších purinových derivátů obsahujících v poloze N ⁷ - <i>terc</i> -butyl	50
3.4.1	Příprava C ⁶ derivátů purinů vázaných přes atom kyslíku	50
3.4.2	Příprava C ⁶ derivátů purinů vázaných přes atom síry	51
3.4.3	Příprava C ⁶ derivátů purinů vázaných přes atom dusíku	52
3.4.4	Příprava C ⁶ derivátů purinů vázaných přes atom uhlíku.....	57
3.5	Cytotoxická a bakteriostatická aktivita připravených sloučenin.....	58
4	Experimentální část.....	60
5	Závěr	72
6	Literatura.....	73
7	Přílohy.....	83

1 Úvod

Purinový skelet je heterocyklická sloučenina, která se nejčastěji vyskytuje v přírodě a často se vyskytuje v celé řadě sloučenin s prokázanými biologickými vlastnostmi.¹

Substituované puriny, jako je adenin a guanin, nebo jejich deriváty hrají zásadní roli v široké škále funkcí u živých druhů.^{2,3} Screening purinových derivátů a jejich biologických aktivit vedl k otevření jeho nových aplikací jako terapeutických látek a bylo zjištěno, že jsou účinné jako chemoterapeutika (antivirová, antibiotická a proti rakovinová činidla).⁴⁻¹⁰ Využívají své chemoterapeutické vlastnosti tím, že způsobují inhibici nebo působí jako substráty enzymů zapojených do metabolismu purinu. 6-Merkaptopurin, thioguanin jsou některé příklady protinádorových léčiv obsahujících strukturu purinu a acyklovir, ganciclovir, carbovir, abacavir jsou několika příklady léčiv na bázi purinů působících jako antivirotika proti oparu nebo AIDS.¹¹⁻¹⁵

V posledních desetiletích byly syntetizovány různě substituované purinové deriváty a testovány na jejich cytotoxickou aktivitu. Rané objevy různých inhibitorů CDK, jako je roscovitin, olomoucín, purvalanol A (Schéma 1), a mnoho dalších sloučenin s nimi souvisejících byly získány systematickou modifikací purinového skeletu.¹⁶⁻²¹

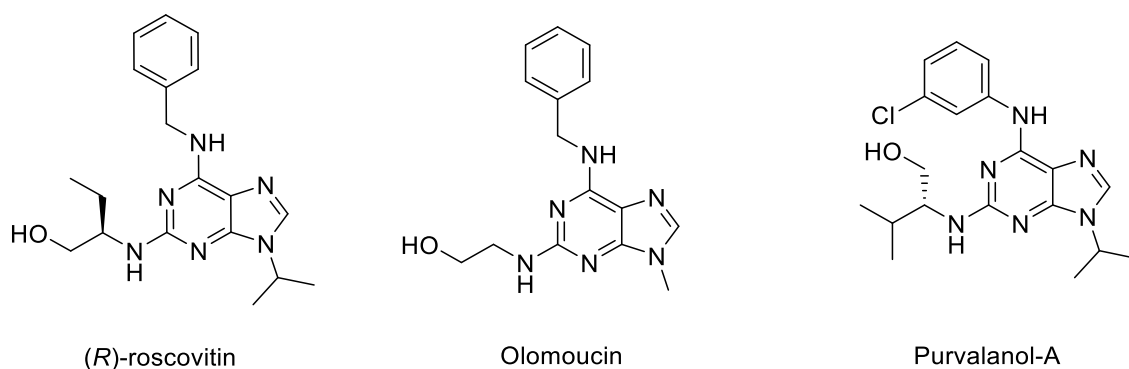


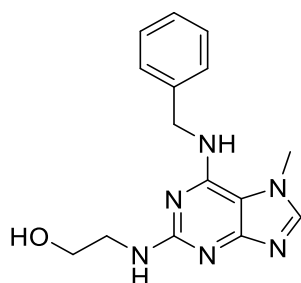
Schéma 1 Inhibitory CDK.

Bylo pozorováno, že většina purinových derivátů, které vykazují silnou protirakovinnou aktivitu, obsahuje aromatický zbytek, jako je benzylamin v poloze 6, o kterém bylo zjištěno, že se váže na hydrofobní kapsu poblíž aktivního místa CDK.²² Léčivo by mělo vykazovat cytotoxický účinek pouze na rakovinné buňky bez ovlivnění normálních buněk.²³

Je tedy obecně patrné, že 6,9-disubstituované a 2,6,9-trisubstituované puriny mají velký potenciál z pohledu biologické aktivity a zejména inhibice CDK. Vystává zde otázka, jaká by mohla být biologická aktivita podobných derivátů, které by se lišily substitucí ne v poloze N⁹, ale v méně obvyklé poloze N⁷.

Biologická aktivita purinových derivátů mající substituent v poloze N⁷ není důkladně prozkoumaná, a to právě z důvodu problematického selektivního zavedení substituentu do polohy N⁷. Nicméně v literatuře jsou popsány biologické účinky některých z nich.

Mezi něž patří *iso*-Olomoucín jako kompetitivní inhibitor cdk1 a cyklin B, které jsou zodpovědné v buněčném cyklu za přechod z G2 fáze do M fáze.^{24–27}



iso-Olomoucín

7-Methylxanthin jako inhibitor DNA gyrázy B u *Escherichia coli* (bakterie). (gyráza - enzym důležitý pro správný průběh replikace DNA umožňující zavíjení a rozvíjení replikované DNA.) Tím zabraňuje množení bakterií.²⁸ Sloučeniny **I** a **II** (Tabulka 1) vykazují významnou cytotoxicitu na rakovinové buněčné linie v plicích. Sloučeniny **III** a **IV** (Tabulka 1) vykazují silnou cytotoxickou aktivitu proti všem testovaným rakovinným buněčným liniím (tlusté střevo, leukémie, plíce, neuroblastom).²⁹

Tabulka 1 Cytotoxické látky

	R ¹	R ²	R ³		R ¹	R ²	R ³
I		Pyrrolidinyl	OCH ₃	III		Pyrrolidinyl	4-CF ₃
II		Piperidinyl	OCH ₃	IV		Pyrrolidinyl	4I

2-Amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]purin vykazuje anti-herpes virovou aktivitu. Pokud byla sloučenina podávána podkožně byla účinnější než acyklovir v modelu virus herpes simplex typu 1.³⁰⁻³² Mezi vazodilatační léčiva mající substituent v poloze N⁷ purinového cyklu, která vyvolávají vazodilataci krevního řečiště (rozšíření cév) patří etofylin.³³

Z pohledu substituce, a tím i ovlivnění biologické aktivity, může být zajímavé připravit výše zmíněné biologicky účinné purinové deriváty (olomoucín, roscovitín, bohemín, purvalanol A) lišící se pozicí substituentu v poloze N⁷ (Schéma 2). Příprava N⁷-substituovaných purinů není bez komplikací. Existují metody, jak toho dosáhnout. Tyto metody ale nejsou obecné. Selektivně umožňují zavést pouze určité skupiny substituentů do zmíněné polohy. *Terc*-butylový substituent v poloze N⁷, kterému se chceme věnovat, není v purinové chemii doposud dobře popsán. Úkolem bude nalézt a propracovat metodu, která toto umožňuje a následně připravit 2,6- resp. 6-substituované deriváty purinu s *terc*-butylovým zbytkem v poloze N⁷ a výsledné sloučeniny otestovat na cytotoxickou účinnost řady leukemických a nádorových linií a aktivitu CDK. Z toho důvodu se rešeršní část ze začátku zabývá cyklin dependentními kinázami, jejich inhibitory a biologickými účinky. Další kapitoly se věnují samotné přípravě N⁷-substituovaných derivátů purinu doposud známých v literatuře.

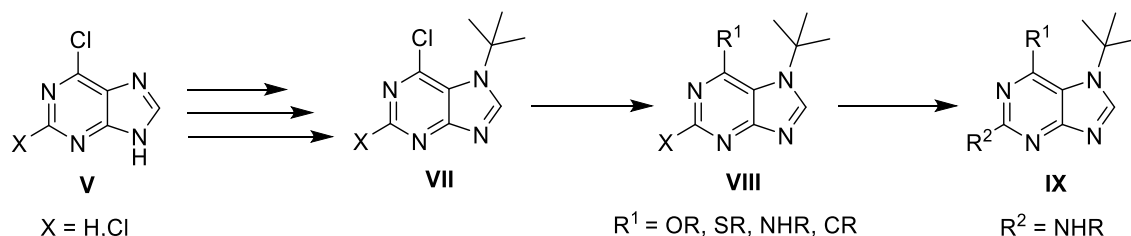


Schéma 2 Princip přípravy cílových sloučenin.

2 Teoretická část

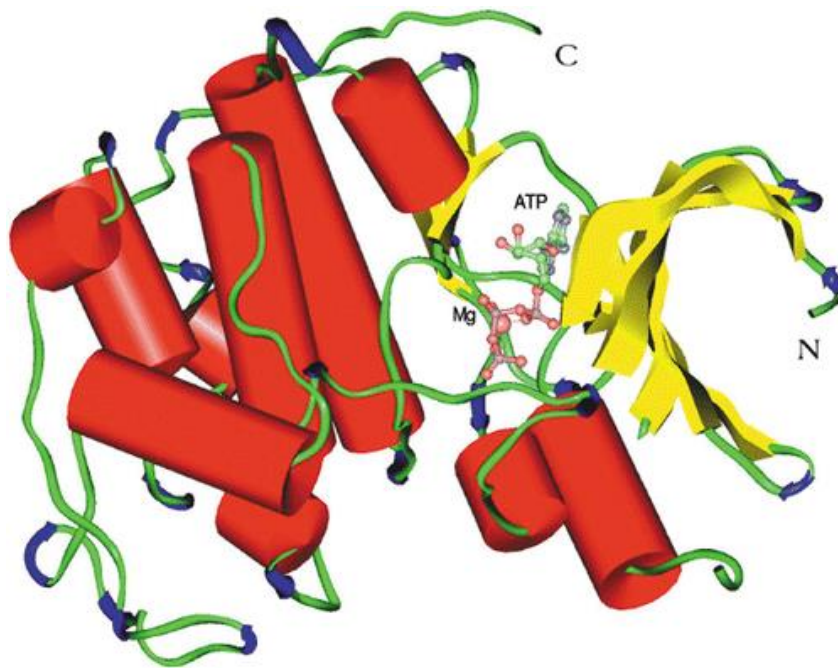
Vzhledem k zaměření bakalářské práce, která si klade za cíl chemickou modifikaci známých purinových inhibitorů CDK (bohemín, olomoucín, roskovitin, purvalanol) v poloze N⁷ *terc*-butylovou skupinou, je tato hlavní kapitola rozdělena na dvě části. První část je věnována stručně chemii a biochemii zmíněným 2,6,9-trisubstituovaným purinům a charakteristikou cyklin dependentních kináz. Druhá část je zaměřena na obecné metody přípravy N⁷-substituovaných purinů.

2.1 Charakteristika CDK a 2,6,9-trisubstituované purinové inhibitory

V této podkapitole je nejprve podán přehled o cyklin dependentních kinázách a poté o biochemii a stručném syntetickém přístupu nejznámějších purinových inhibitorů CDK, které sloužily jako předlohy pro jejich modifikaci, mající v poloze 2 a 6 substituent navázaný přes atom dusíku a substituent v poloze N⁹ purinového skeletu.

2.1.1 Cyklin dependentní kináza

Cyklus dělení buněk je řízen cyklin dependentními kinázami (Cdk), které sestávají z katalytické podjednotky (cdk1-cdk8) a regulační podjednotky (cyklin A-H). Cdk2, který reguluje fázový přechod buněčného cyklu G1/S a replikaci DNA, sestává ze dvou domén, menší N-terminální domény a větší C-terminální domény, ATP a všechny inhibitory se vážou mezi obě domény.³⁴



Obrázek 1 Kabschův-Sanderův model struktury komplexu ATP-cdk2. N a C konce proteinu jsou označeny N a C; Molekula ATP je znázorněna s koordinovaným iontem Mg²⁺. C-terminální doména sestává primárně z α -helixů (válců) a N-terminální doména sestává převážně z β -listů (stuhy).³⁴

Holoenzymy cyklin dependentních kináz se skládají z katalytické podjednotky, Cdk a regulační podjednotky, cyklinů. Charakteristickým znakem cyklin dependentních kináz je, že jsou neaktivní ve své monomerní formě a pro aktivaci vyžadují spojení s požadovaným cyklinovým partnerem. Tento způsob regulace má dva hlavní důsledky pro funkci Cdk.

Za prvé, načasování aktivace Cdk může být řízeno načasováním exprese konkrétní cyklinové podjednotky.

Za druhé, cykliny mohou také přispívat k substrátové specificitě konkrétní katalytické podjednotky těsným spojením se substráty. Časová aktivace konkrétních Cdk podjednotek prostřednictvím změn v množství určitých partnerů cyklinu je tedy fyzicky spojena s výběrem substrátu, čímž se poskytuje základ specificity kinázy.

Tyto regulační rysy, i když jsou centrální pro řízení buněčného cyklu, nejsou v žádném případě omezeny na tento proces. Strukturální a regulační rámec Cdks byl použit v mnoha procesech mimo kontrolu buněčného dělení, včetně transkripce, opravy DNA a post mitotických procesů. I když načasování aktivace Cdk může být dostatečné načasováním vazby cyklinů, k zajištění dalších úrovní kontroly se používá řada

odlišných regulačních drah. Mezi ně patří fosforylace, navázání inhibitorů, regulované sestavování holoenzymů.³⁵⁻³⁸

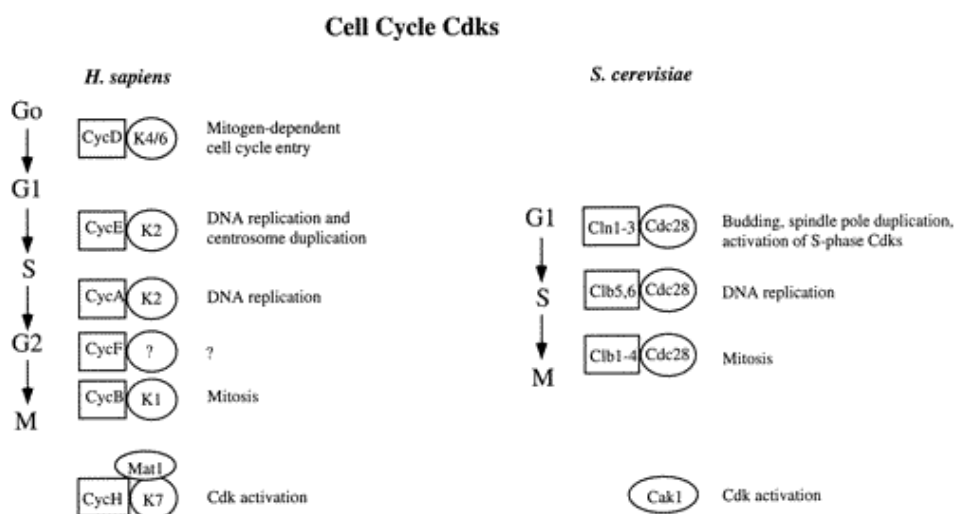
2.1.2 Klasifikace cyklin dependentních kináz

Pučící a štěpící se kvasinky slouží jako důležité genetické systémy pro pochopení regulace a funkce Cdk. Tyto organismy používají primárně jednu Cdk podjednotku (Cdc28 v *Saccharomyces cerevisiae* a Cdk1 (známý také jako Cdc2) v *Schizosaccharomyces pombe*) k provádění všech hlavních kroků cyklu buněčného dělení (Obrázek 2).³⁷ Pro dosažení časové kontroly událostí buněčného cyklu, odlišné cyklinové podjednotky jsou syntetizovány ve specifických fázích buněčného cyklu a tyto cykliny dávají Cdk odlišnou substrátovou specificitu. V pučících kvasnicích koordinují tři částečně zbytečné G1 cykliny (Cln1, Cln2 a Cln3) procesy pučení a zdvojení pólového tělíska vřetene a jsou zodpovědné za události vedoucí k aktivaci primární S-fázové Cdk, Cdc28 spojené s typem B cykliny Clb5 nebo Clb6. Čtyři další cykliny B typu (Clbs1-4) koordinují pozdní S-fázové a mitotické procesy.

Naproti tomu více buněčná eukaryota obsahují poněkud složitější zastoupení Cdk. V savčích buňkách je 5 různých Cdk podjednotek [Cdk1 (známý také jako Cdc2), Cdk2, Cdk3, Cdk4 a Cdk6] a 10 různých cyklinových podjednotek [A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3, E1, E2, a F] přímo přispívajících k procesu buněčného dělení. Tyto hlavní typy cyklinů se vyskytují od *C. elegans* (Háďátka obecné) po savce, ale u savců má každý typ cyklinu (s možnou výjimkou cyklinu F) více podtypů. U některých tříd cyklinů (např. Cyklinů typu D) se předpokládá, že každý podtyp funguje do značné míry rovnocenně, ale je používán tkáňově specifickými způsoby.^{39,40} Kromě toho může cyklin B1 kompenzovat ztrátu cyklinu B2 ve vývoji myši, což znamená, že cyklin B1 může zacílit Cdk1 na substráty cyklinu B2. Distribuce různých Cdk komplexů během buněčného cyklu u savců je znázorněna na obrázku.

Cykliny D-typu interagují přednostně s Cdk4 a Cdk6 a tyto komplexy fungují primárně během fáze G1 buněčného cyklu. Syntéza a stabilita cyklinu typu D jsou řízeny hladinami růstového faktoru a aktivace cyklin kináz typu D je limitující rychlost v progresi G1 ve fibroblastech. Cykliny typu E vytvářejí aktivní komplexy s Cdk2 a hojnost těchto komplexů vrcholí během přechodu G1 / S. Cyklin E a Cdk2 jsou skutečně nutné pro zahájení replikace DNA (Obrázek 2). Cyklin A může tvořit komplexy s Cdk1 a Cdk2 během fází S a G2 a tyto komplexy hrají pozitivní roli při

replikaci a průběhu G2. Cykliny typu B tvoří komplexy s Cdk1 během G2 a tyto komplexy koordinují mnoho událostí potřebných pro mitózu.^{38,41,42}

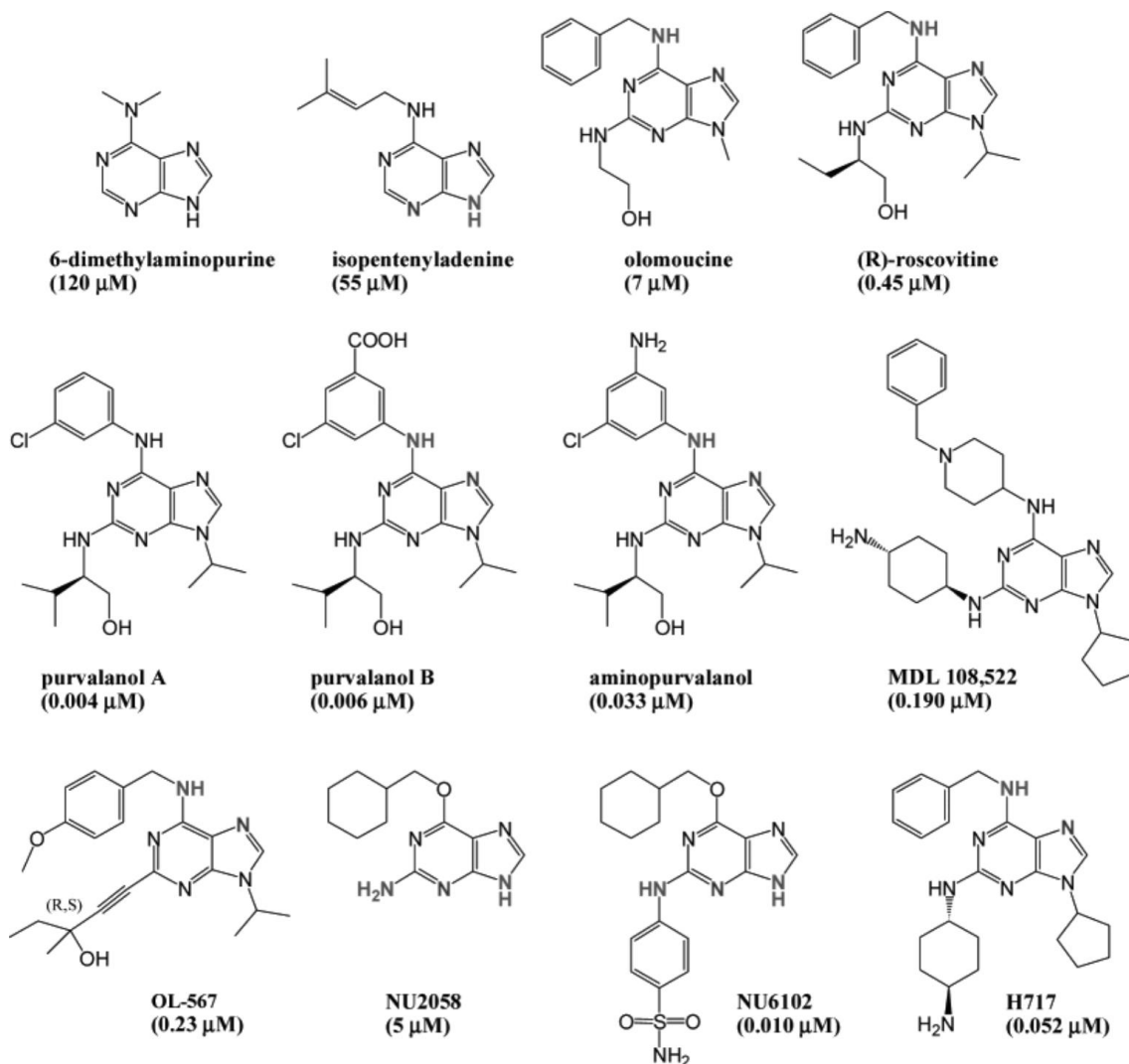


Obrázek 2 Funkce cyklin dependentních kináz v buněčném cyklu.³⁸

2.1.3 Inhibitory s purinovým skeletem

V 80. letech byl často používán jako „nespecifický inhibitor kinázy“ 6-dimethylaminopurin (6-DMAP) (Obrázek 3). 6-DMAP byl původně objeven Lionelem Rebhunem jako analog puromycinu, který na rozdíl od původní struktury nebyl schopen inhibovat syntézu proteinu, avšak 6-DMAP silně inhiboval mitózu embrya mořského ježka.⁴³ Mechanismus působení 6-DMAP na dělení buněk zůstal tajemstvím, dokud nebyly objeveny jeho inhibiční vlastnosti na fosforylaci specifické pro M-fázi a histon H1 kinázu.^{44,45} Účinek byl potvrzen v časných skriningových testech a hodnota IC₅₀ byla stanovena na 120 μM. Při screeningu několika souvisejících purinů, bylo zjištěno, že isopentenyladenin (Obrázek 3) byl o něco aktivnější (IC₅₀: 55 μM).⁴⁶ Bohužel obě sloučeniny byly málo zajímavé kvůli jejich špatné selektivitě. Isopentenyladenin je široce studovaný rostlinný hormon (cytokinin), a to byl důvod počátečního kontaktu s Jaroslavem Veselým a Miroslavem Strnadem. Jaroslav Veselý otestoval všechny dostupné analogy isopentenyladeninu a další substituované puriny na CDK1 / cyklin B. Výsledky zůstaly frustrující až do objevení mírně aktivního inhibitoru, 2-hydroxyethylamino-6-benzylamino-9-methylpurin (Obrázek 3), který byl pojmenován jako olomoucín (z Olomouce, domov univerzity Palackého v České republice).⁴⁷ Dva rysy byly zvláště zajímavé u olomoucínu, zlepšená účinnost (IC₅₀: 7 μM) na rozdíl od 6-DMAP a isopentenyladeninu, neočekávané selektivity pro CDK a v menší míře pro

MAP kinázy. To bylo jasně proti (tehdejšímu) současnému dogmatu, které uvádělo, že by nikdy nebyla získána selektivita s inhibitory zaměřenými na ATP vázající úsek kináz. Bylo zjištěno, že Olomoucine inhibuje CDK1 a soutěží s vazbou ATP na enzym. Studie strukturní aktivity s 81 puriny ukázala, že inhibiční vlastnosti kinázy byly omezeny na 2,6,9-trisubstituovanou purinovou podskupinu.⁴⁸



Obrázek 3 Deriváty purinů inhibujících CDK. Pod každou sloučeninou jsou uvedeny hodnoty IC_{50} pro CDK1 / cyklin B.⁴³

2.1.4 Vztah buněčného cyklu s cyklin dependentními kinázami

Progrese buněčného cyklu je řízena aktivací a inhibicí buněčných faktorů. Rovnováha mezi těmito pozitivně a negativně působícími regulátory zaručuje správnou progresi buněčného cyklu v normálních buňkách a usnadňuje buněčnou reakci na různé stresové podněty. Zvýšená aktivita pozitivních regulátorů buněčného cyklu v rakovinných buňkách je často doprovázena ztrátou nebo inaktivací inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDK). Suplementace buněčných inhibitorů CDK farmakologickými protějšky je velmi slibnou terapeutickou možností. Vytvořené farmakologické inhibitory CDK patří do různých tříd sloučenin a vykazují různé CDK inhibiční vlastnosti.

Postup v buněčném cyklu je regulován pozitivními a negativními faktory. Každá fáze buněčného cyklu je regulována prostřednictvím komplexů skládajících se z cyklin-dependentních kináz (CDK) a jejich regulačních podjednotek nazývaných cykliny.⁴⁹

2.1.5 Buněčné účinky 2,6,9 - trisubstituovaných purinů

Inhibiční puriny CDK mají čtyři hlavní účinky:

Nejprve dobře inhibují proliferaci vedoucí k zastavení buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi, v závislosti na modelu a podmínkách. Tyto antiproliferativní účinky jsou v podstatě způsobeny inhibicí CDK2 a CDK1.⁵⁰

Za druhé, vyvolávají apoptózu v mitotických buňkách, obvykle když jsou v kombinaci s dalším inhibitorem. Například bylo zjištěno, že roscovitin a olomoucín synergizují s inhibitorem farnesyltransferázy a vyvolávají apoptózu lidských rakovinných buněčných linií. Tato situace byla také ilustrována purvalanolem A a taxolem. Mikrotubulární stabilizace taxolem následovaná inhibicí CDK1 purvalanolem A vedla k masivní apoptóze v HeLa buňkách (HeLa je buněčná linie lidských epiteliálních buněk. Jedná se o nádorové buňky. Buňky HeLa jsou nesmrtelná buněčná linie, to znamená, že se mohou neustále množit. Nepodléhají Hayflickovu limitu, který způsobí po několika desítkách dělení odumření buněk z důvodu zkrácených telomer. Tento limit HeLa buňky obchází aktivací telomeráz, enzymů, které jsou schopné zpětně prodloužit telomery). Léčba samotným taxolem nebo purvalanolem A a společná léčba oběma, ale v opačném pořadí (purvalanol A následovaný taxolem), byly neúčinné, což prokázalo působivou uspořádanou spoluprací mezi oběma léky.^{51,52}

Za třetí vyvolávají diferenciaci v několika modelech. Například *in vitro* diferenciace myších erytro-leukemických buněk byla vyvolána kombinovanou sekvenční inhibicí CDK2 (s roscovitinem) a CDK6 (nikoli CDK4) (s p16). Opačná sekvence inhibice byla neúčinná.⁵³

Za čtvrté, také chrání buňky před apoptózou pomocí mechanismů, které ještě nebyly identifikovány. Příklady kdy purinové inhibitory CDK zabraňují apoptóze vyvolané cAMP v leukemických buňkách potkana, apoptóze vyvolané etoposidem ve fibroblastech potkana, a HIV vyvolané buněčné smrti v HIV vytvořeném syncytiu.⁵⁴

2.1.6 Syntetický přístup k 2,6,9-trisubstituovaným purinům

Z úvodu Bc. práce bylo patrné, že 6,9-di ale zejména 2,6,9-trisubstituované puriny obsahující v polohách 2 a 6 substituenty navázané přes dusíkový atom, mezi něž bohemín, olomoucín, roskovitin a purvalanol A patří, vykazují vysokou účinnost na inhibici CDK. Existuje několik způsobů, jak je lze obecně připravit. Nejčastěji se vychází z 6-chlorpurinu (pro přípravu 2,9-disubstituovaných purinů) nebo z 2,6-dichlorpurinu. Zmíněné sloučeniny se pak připravují postupnou substitucí s tím, že se využívá rozdílné reaktivity atomů chloru.

V případě 6,9-disubstituovaných purinů se nejčastěji nejprve zavede alkylation uhlovodíkový zbytek do polohy N⁹ a následně se substituují atom chloru v poloze 6. Nežádoucí N⁷-izomer vzniklý v prvním kroku se odstraní po druhém kroku chromatograficky.²¹ Příklad viz. schéma 3.

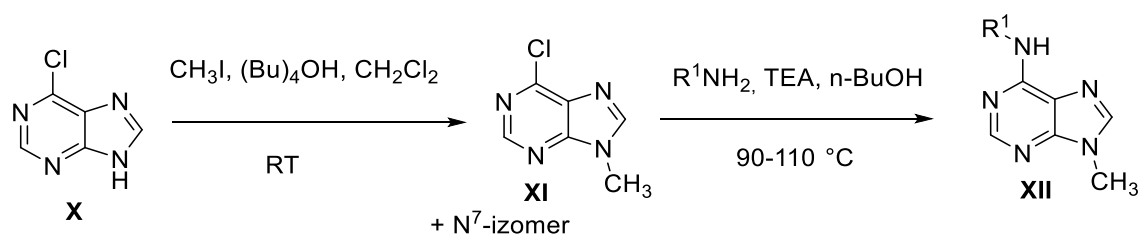


Schéma 3 Příklad syntézy 6,9-disubstituovaných purinů.

2,6,9-Trisubstituované puriny s alkylovými substituenty vázané na dusík se dají z 2,6-dichlorpurinu připravit několika klasickými modifikacemi (viz. schéma 4).²¹ Nejčastěji se S_N reakcí substituují reaktivnější chlor v poloze 6, posléze za drsnějších podmínek v poloze 2 a nakonec alkylation reakcí se substituují atom dusíku v poloze 9. Jiná modifikace představuje alkylation na atomu N⁹ připraveného 2-chlor-6-alkylaminopurinu a nakonec substituce atomu chloru v poloze 2.

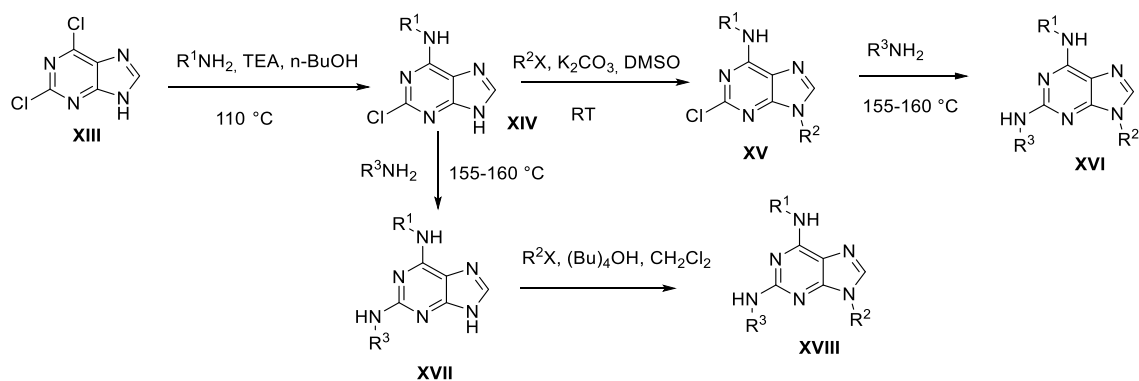


Schéma 4 Obecný přístup k syntéze 2,6,9-trisubstituovaných purinů.

Problematický první krok zahrnující nejprve alkylation 2,6-dichlorpurinu do polohy N^9 , kdy vzniká směs izomerů N^7/N^9 byl později modifikován u některých derivátů (roscovitin⁵⁵) alkylation isopropylalkoholem pomocí Mitsunobu reakcí na N^9 , čímž byl získán 2,6-dichlor-9-isopropylpurin. Dřívější konvenční způsob přípravy tohoto klíčového meziprojektu používal isopropylhalogenid jako alkylation činidlo, ale nevýhodou této metody byla zmíněná špatná regioselektivita jako značné množství vedlejšího produktu, což je N^7 -izomer, který byl také vytvořen. Surový produkt musí být čištěn vícenásobnou krystalizací nebo sloupcovou chromatografií. Metoda navíc používá toxický a kancerogenní isopropylhalogenid. Z tohoto důvodu se používá Mitsunobu alkylation reakce, při které se jako alkylation činidlo používá isopropanol (Schéma 5). Reakční teplota byla udržována v rozmezí 20–25 °C, aby se minimalizovala tvorba nežádoucího N^7 -izomeru, na rozdíl od Weibing Lu⁵⁶, který provedl alkylation při 70 °C. Bylo zjištěno, že regioselektivita alkylation se snižovala se zvyšováním reakční teploty. Tato metoda probíhala velmi hladce a ve srovnání s halogenidovou metodou byla mnohem regioselektivnější.

Druhým krokem vedoucí k přípravě 2-chlor-6*N*-substituovaných-9-isopropylpurinů, je nukleofilní substituce v poloze purinu C^6 aminy. Reakce je prováděna v *n*-propanolu a jako pomocná báze je použit *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylamin (Hunigova báze). Reakční teplota je udržována v rozmezí 80–100 °C (Schéma 5). Reakční doba se pohybuje od 3 do 6 hodin, v závislosti na reakční teplotě a aminové reaktivitě. Surové meziprojektu se v případě potřeby čistí krystalizací z isopropanolu. Výtěžky jsou ve všech případech uspokojivé (70–85 %).

Poslední krok je proveden dříve popsanou metodou. Vhodný amin pro substituci S_N2 na C^2 byl použit v přebytku (5–20 ekv.) (Schéma 5). Reakční teplota byla

udržována na 150–160 °C (uzavřená zkumavka) a reakční doba se pohybovala od několika hodin v případě reaktivních aminů (všechny C²-deriváty roskovitinu) do 72 hodin v případech méně reaktivních stericky bráněných aminoalkoholů.⁵⁷

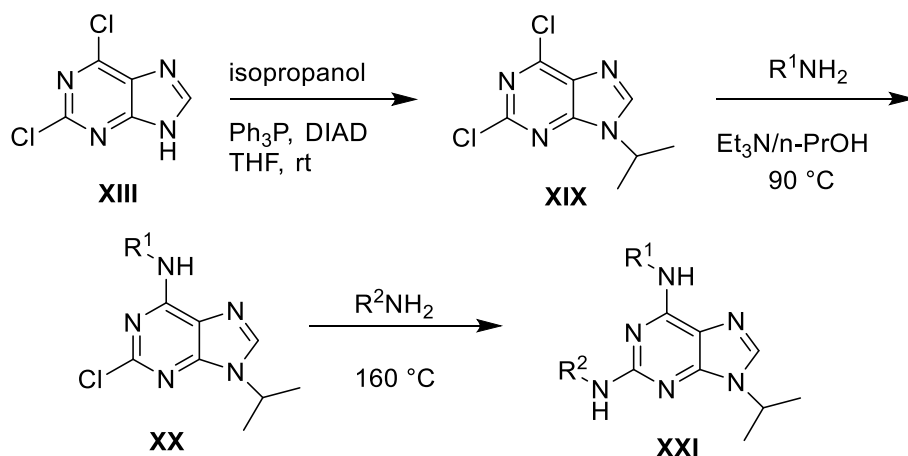


Schéma 5 Příklad přípravy 2,6,9-trisubstituovaného purinu za použití Mitsunobu reakce mající v poloze N⁹ isopropyl.

V literatuře je možné nalézt i typy syntéz vycházející z jiných výchozích látek než z 2,6-dichlorpurinu. Jako příklad je zde uvedena syntéza Olomoucínu z 9-methylguaninu: Schéma 6⁵⁵

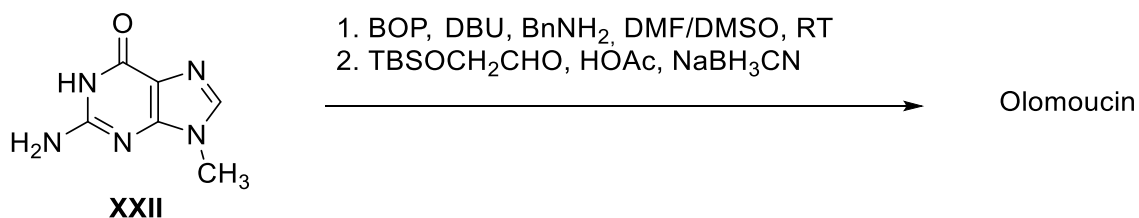


Schéma 6 Příprava Olomoucínu.

2.2 Syntetický přístup k 7-substituovaným purinům

Nyní budou stručně uvedeny doposud známé metody umožňující přípravu N⁷-substituovaných purinů

2.2.1 Metoda přímé alkylace

Pro syntézu N⁷-substituovaných purinů lze využít přímou alkylaci, kdy reaguje příslušný purin s halogenačním činidlem v přítomnosti báze jako je např. uhličitan draselný nebo hydrid sodný. Jako rozpouštědlo se nejčastěji využívají polární rozpouštědla jako nejčastěji aceton, DMF nebo DMSO. Touto reakcí vzniká směs izomerů, a to N⁷ a N⁹ izomerů s výraznou převahou N⁹ izomeru (Schéma 7). Tato metoda je však omezená na primární a sekundární halogenidy. Alkylaci podléhají snadněji substituované puriny, jako jsou například guanin, adenin a halogen purin.^{29,58-61} Příklady, kdy se alkyluje 6 resp. 2,6-dichlorpurin alkylačními činidly za vzniku směsi izomeru N⁷ a predominujícího N⁹ lze v literatuře najít celou řadu. Pro přípravu čistých N⁷ izomerů většinou nezbyvá, než směs někdy velmi pracně dělit chromatografickou separací.

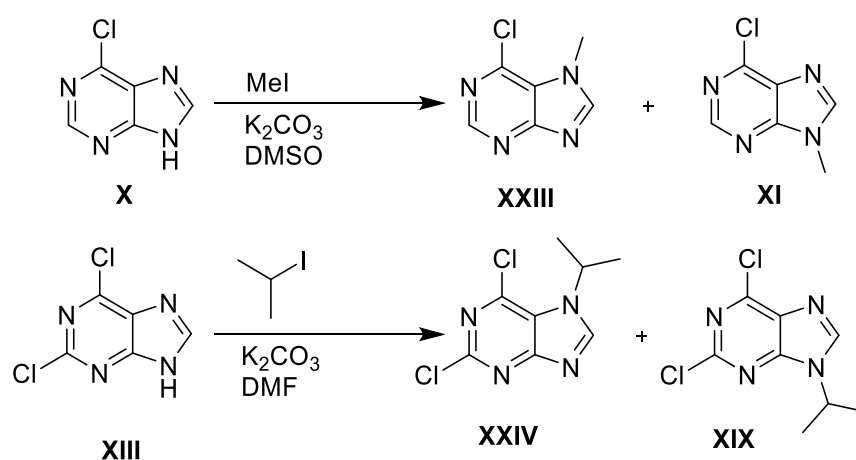


Schéma 7 Příklady alkylačních reakcí chlorpurinů.

Z teorie kineticky a termodynamicky řízené reakce, kdy kinetický produkt je ten, který vzniká nejrychleji a za nižší teploty. Produkt, který rychle vzniká, se pomalu přeměňuje na izomer převládající za rovnovážných podmínek. S rostoucí teplotou se izomerizace urychluje. Obvykle je kinetický produkt méně termodynamicky stálý. Za termodynamický produkt můžeme považovat takový, který převažuje v rovnovážné

směsi. Z této teorie můžeme N⁷ izomer označit jako produkt kinetický a N⁹ izomer jako produkt termodynamický.⁶²

2.2.2 Příprava přes N⁹ chráněné 7,8-dihydropuriny

Přímá alkylace purinových bází nejčastěji míří k tvorbě jak N⁷, tak N⁹ isomerů. Z toho důvodu byla popsána lepší metoda zahrnující dočasnou ochranu polohy N⁹ pomocí ochranných skupin (Boc, trityl, benzyl),^{63,64,65} redukcí imidazolového cyklu a následnou selektivní alkyací do polohy N⁷ spojenou s deprotekcí a oxidací. Což umožňuje následnou syntézu N⁷ substituovaného izomeru bez tvorby N⁹ izomeru.

Vývoj zmíněné spolehlivé a selektivní syntézy N⁷-substituovaných purinů nejprve vedl k syntéze N⁷-alkyl-6-halo a N⁷-alkyl-2,6-dihalopurinů jejíž podstatou byla reakce 9-trityl(resp. benzyl)ovaných-7,8-dihydropurinů s alkylhalogenidem v přítomnosti báze.⁶³ Jedním problémem v popsaném postupu bylo to, že roztoky 9-benzyl-6-chlor-7,8-dihydropurinu a 6-chlor-9-trityl-7,8-dihydropurinu se projevily náchylností ke spontánní oxidaci na odpovídající puriny v přítomnost vzduchu. Jelikož je známo, že 7,8-dihydropuriny mající substituenty odebírající elektrony v polohách 2, 6 nebo 8 jsou odolnější na oxidaci, bylo předpovězeno, že zavedení skupin odebírajících elektrony do polohy N⁹ 7,8-dihydropurinu by mohlo zmenšit hustotu elektronů, a tak zvětšit celkovou stabilitu 7,8-dihydropurinů i vůči oxidaci. Z toho důvodu byla zvolena ochranná skupina Boc. Ta je kvantitativně navázána do polohy N⁹ a je lehce štěpitelná v kyselém prostředí. V reakčním schéma 8 je vidět 6-chlorpurin, kterému je zavedena ochranná skupina Boc do polohy N⁹ a následně je převeden redukcí na klíčový 7,8-dihydropurin **XXVI**.⁶⁴

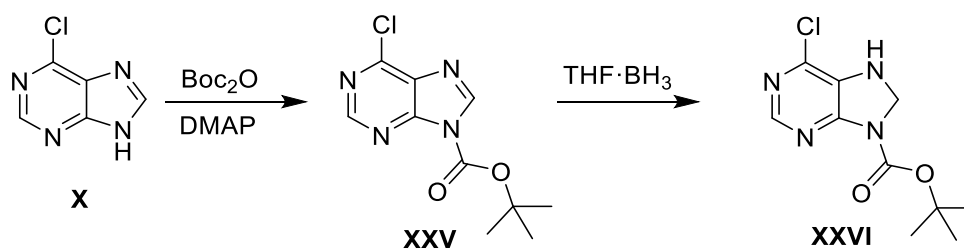


Schéma 8 Použití chránicí skupiny Boc.

Deprotonace dihydropurinu **XXVI** byla provedena pomocí LiHMDS v bezvodém roztoku THF a DMF při -78 °C. Poté bylo přidáno alkylačního činidla a směs byla zahřáta na laboratorní teplotu, což vedlo k tvorbě alkylovaného produktu v poloze N⁷ **XXVII** (Schéma 9). Chránicí skupina Boc byla následně snadno odštěpena

pomocí kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu a obdržený N⁷-substituovaný purin **XXVIII** byl následně bez čištění oxidován pomocí MnO₂ ve stejném rozpouštědle. Tuto metodu lze využít pro zavedení primárních a sekundárních alkylů, kdy se výtěžky N⁷ izomerů pohybují v rozmezí 65–91 %.

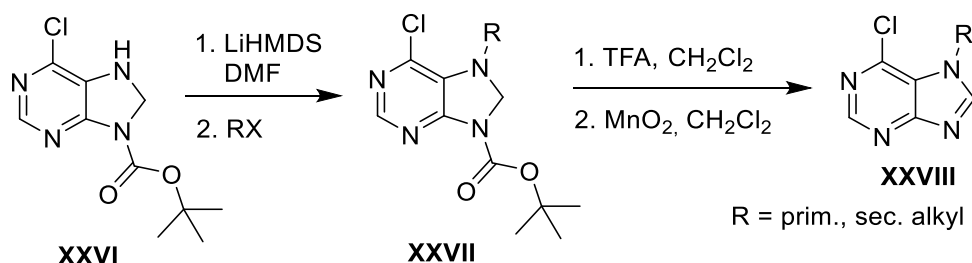


Schéma 9 Alkylace a odštěpení Boc.

2.2.3 Alkylace purinů za použití Grignardových činidel

Další metoda, která by mohla spíše spadat i do kapitoly přímých alkylací alkylačními činidly, je za použití Grignardových sloučenin. Tyto sloučeniny zde mají funkci jako báze, ale svými komplexačními vlastnosti umožňují navíc i selektivnější substituci do polohy N⁷, na rozdíl od klasických bází, kde je situace opačná. (viz. kapitola 2.2.1).

Metoda vedoucí k přípravě N⁷ substituovaných purinů za použití Grignardových činidel byla vyvinuta z důvodu potřebného vysokého množství N⁷-methyl-6-chlorpurinu pro in vivo studie. Možný způsob, jak tuto látku připravit byl takový, který využíval již zmiňovaný způsob redukce/oxidace s využitím protekce/deprotekce (viz. kapitola 2.2.2). Jelikož bylo potřeba tuto syntézu urychlit a zjednodušit, tak byly hledány podmínky pro změnu selektivity, podporující alkylaci do polohy N⁷. Bylo nalezeno, že deprotonaci 6-chlorpurinu pomocí *i*-PrMgCl·LiCl a poté alkylací methyljodidem byl získán chtěný regioizomer se selektivitou 9:1 ve prospěch N⁷ polohy (Schéma 10).

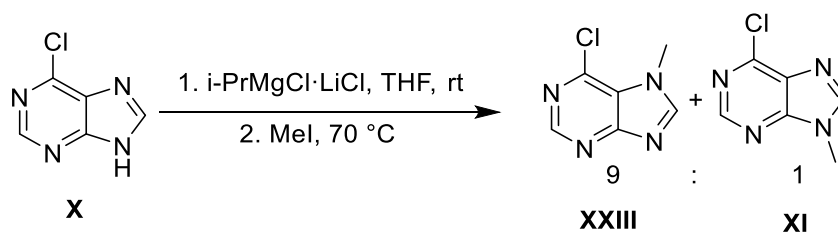
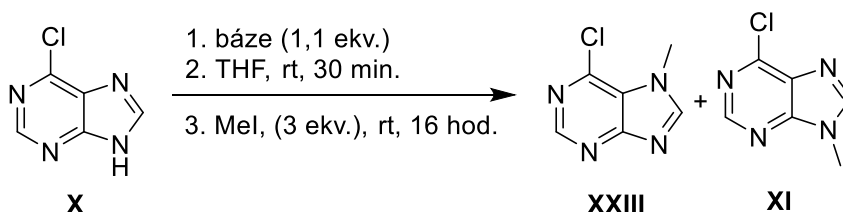


Schéma 10 Použití Grignardových činidel.

Použitím *i*-PrMgCl, který se nenachází v komplexu s LiCl byla vylepšena selektivita N⁷/N⁹ na 99:1 (Schéma 10), s dobrou konverzí za laboratorní teploty. Díky

tomuto zjištění byl testován MeMgCl, který reagoval s obdobnou selektivitou a vykazoval lepší výtěžky. Změněním Grignardova činidla z chloridu na bromid nebo jodid, se prudce snížila konverze a selektivita (schéma 11). Tato metoda byla popsána spíše pro zavedení reaktivnějších primárních alkylhalogenidů.⁶⁶



báze	konverze	N7 / N9
<i>i</i> -PrMgCl·LiCl	64	25:1
<i>s</i> -BuMgCl·LiCl	50	26:1
TMPMgCl·LiCl	50	15:1
<i>i</i> -PrMgCl	65	>99:1
MeMgCl	73	>99:1
MeMgBr	<5	21:1
MeMgI	<5	20:1
TMPMgCl	65	72:1

2.2.4 Schéma 11 Reakční schéma a screening bází pro methyloci 6-chlorpurinu. Cyklizační metody vedoucí k přípravě 7-substituovaných purinů

Jednou z metod vedoucí k jednoznačné přípravě N⁷ substituovaného purinu je příprava vhodně substituovaného pyrimidinového nebo imidazolového prekursoru, u kterého se následně uzavírá imidazolový či pyrimidinový skelet.

2.2.4.1 Příprava 7-substituovaných purinů uzávěrem imidazolového cyklu (pyrimidinové prekurzory)

Byla vyvinuta syntéza pro tento typ sloučenin, která má, zdá se, širší uplatnění. Tato metoda je založena na alkylation příslušných *N*-(4-amino-5-pyrimidinyl)formamidů alkylhalogenidem v uhličitanu draselném v *N,N*-dimethylformamidu jako rozpouštědla, které se osvědčilo v mnoha jiných alkylationech. Uzávěr imidazolového cyklu připravených pyrimidinových prekurzorů je pak proveden formamidem.

Jako konkrétní příklad je uvedena reakce vedoucí k N⁷-benzylovanému purinu **XXXI**. Tato reakce se nejprve aplikovala na 5-pyrimidinylformamid **XXIX** (Schéma 12) a benzylchlorid při laboratorní teplotě, čímž se získá dobrý výtěžek

5-pyrimidinylbenzylformamid **XXX** (Schéma 12). Cyklizace této sloučeniny na 6,7-substituovaný purin **XXXI** (Schéma 12) byla provedena zahřátím ve formamidu.⁶⁷

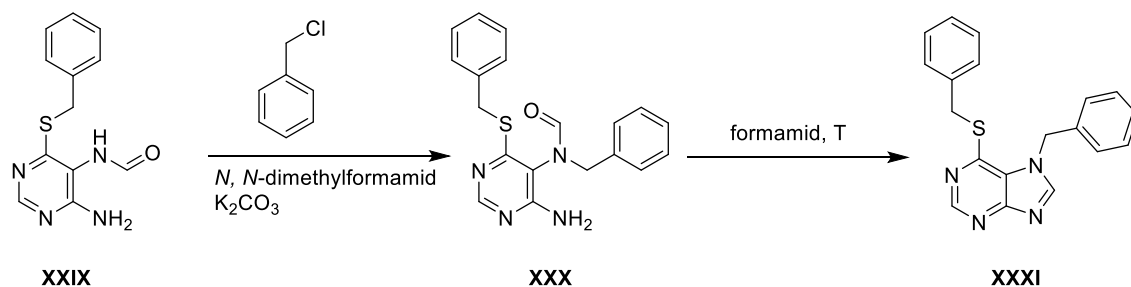


Schéma 12 Příklad uzavření imidazolového cyklu.

Aby se tato reakce rozšířila na chlorpyrimidiny coby užitečnější prekurzory, bylo nutné připravit požadované 5-pyrimidinylformamidy **XXXIII**. Ty se připravily formylační reakcí sloučeniny **XXXII** v 98 % kyselině mravenčí při laboratorní teplotě (Schéma 13).⁶⁷

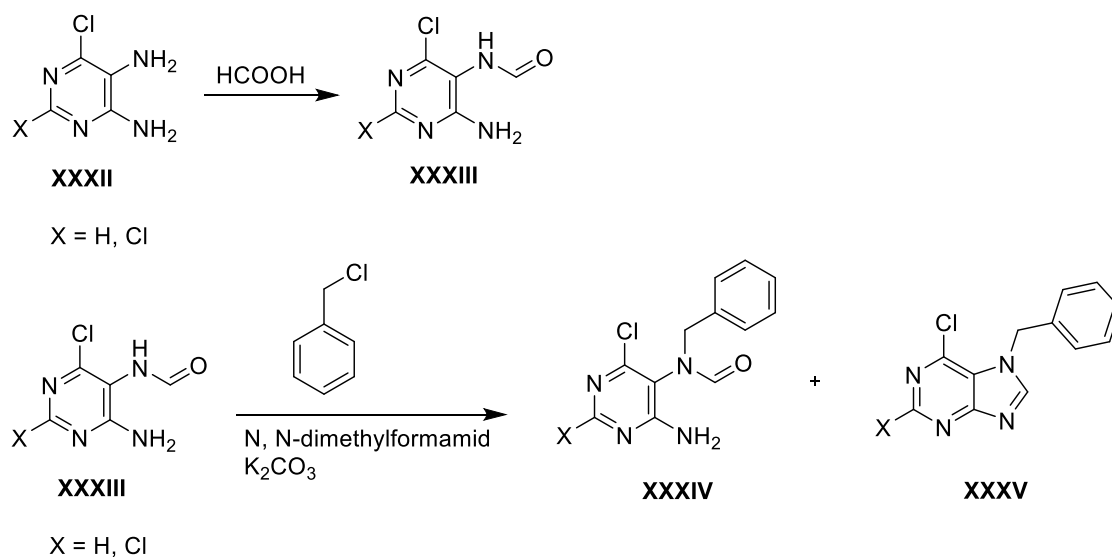


Schéma 13 Příklad uzavření imidazolového cyklu.

Alkylace 5-pyrimidinylformamidů **XXXIII** s benzylchloridem (Schéma 13) byla ponechána probíhat tři dny při laboratorní teplotě. Na konci došlo k alkylationi formamidu **XXXIII** s následnou částečnou cyklizací na purin **XXXV**. Sloučenina **XXXIV**, tak sloučenina **XXXV** (Schéma 13) byly izolovány ze směsi.⁶⁷

Podobný princip této metody se používá i na přípravu problematických N⁹-izomerů, jako je například zavedení terciárního zbytku u 9-*terc*-butyl-6-chlor-9*H*-purinu (Schéma 14).⁶⁸

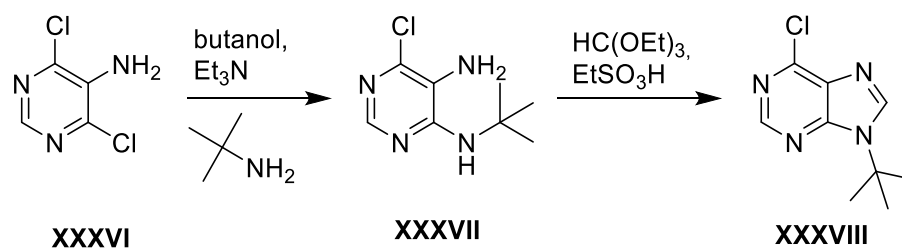


Schéma 14 Zavedení terciárního zbytku.

2.2.4.2 Příprava 7-substituovaných purinů uzávěrem pyrimidinového cyklu (imidazolové prekurzory)

Jako příklad tohoto principu je uvedena syntéza 7-methylhypoxanthinu **XLI**, který byl připraven z 4-aminoimidazolkarboxamidu **XL** s následným uzávěrem pyrimidinového cyklu formamidem. Chlorace 7-methylhypoxanthinu **XLI** poskytla 7-methyl-6-chlorpurin **XXIII** (Schéma 15), který lze použít pro další substituce.

Příslušný 4-aminoimidazolkarboxamid **XL** lze připravit z nitrilu **XXXIX** katalytickou redukcí s Raneyovým niklem. 4-Aminoimidazolkarboxamid **XL** byl izolován jako hydrochlorid a tento produkt po zahřátí s formamidem poskytl 7-methylhypoxanthin (Schéma 15). Chlorace 7-methylhypoxanthinu s oxychloridem fosforečným poskytla 7-methyl-6-chlorpurin **XXIII**.⁶⁹ Průběh reakce je znázorněn ve schématu 15.

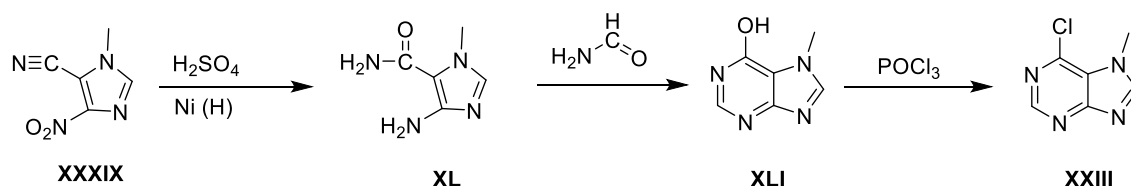


Schéma 15 Příklad uzavření pyrimidinového cyklu.

Jako další příklad přípravy 7-substituovaných purinů uzávěrem pyrimidinového cyklu je uvedena reakce vedoucí k 7-benzyl-2-substituovanému adeninu **XLIV**, který lze připravit z 4-aminoimidazolnitrilu **XLII** reakcí s methyl-pentanoátem a kyselinou mravenčí v bezvodém prostředí za vzniku 4-substituovaného imidazolu **XLIII**. Získaná sloučenina se pak cyklizuje na 7-benzyl-2-substituovaný adenin **XLIV** reakcí s amoniakem (Schéma 16).⁷⁰

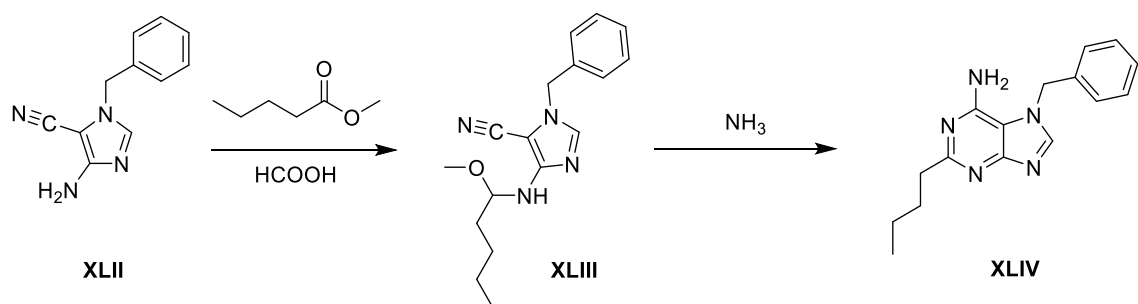


Schéma 16 Příklad uzavření pyrimidinového cyklu.

2.2.5 Silylační metoda

Jedná se o metodu, která se používá v purinové chemii převážně k zavedení glykosylů do polohy N⁹, ale i do polohy N⁷.

Jako první využil silylované purinové báze Birkofer.⁷¹ Jednalo se o reakci 1-halogenosacharidu a silylovaného purinového derivátu (2,6-dihydroxy-7,9-dihydro-8*H*-purin-8-on), kde jako katalyzátor byly použity organortuťnaté a stříbrné soli. Tuto metodu modifikoval Vorbrüggen. Vyhnul se teplotně nestabilním halogenosacharidům, místo nich použil peracetylové sacharidy a místo toxických katalyzátorů použil Lewisovy kyseliny, jako jsou trimetylsilyltriflát (TMSOTf), SnCl₄ a TiCl₄.⁷² Zavedení trimetylsilylových skupin na purin vede ke zvýšení lipofility a rozpustnosti, což umožňuje uskutečnit reakci v homogenní fázi. Příkladem využití této metody může být příprava benzoylovaného 6-chlorpurin-9-β-ribofuranosidu **XLVI** za katalýzy TMSOTf v refluxujícím acetonitrilu s 94 % výtěžkem (Schéma 17).

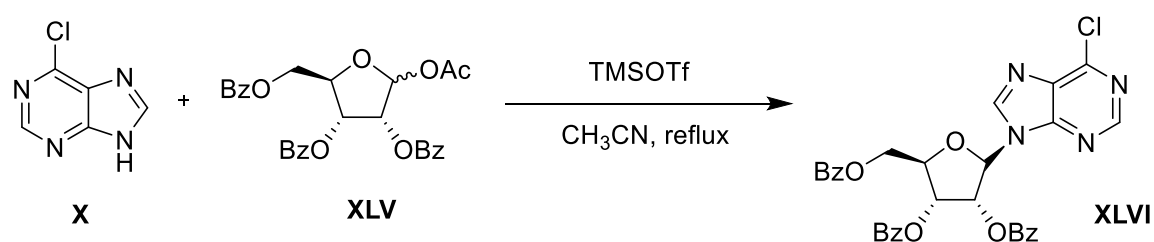


Schéma 17 Glykosylace silylační metodou.

Výsledek reakce z pohledu regioselectivity navázaného monosacharidu ovlivňuje jakákoliv změna reakčních podmínek. Struktura reagujících látek, teplota, katalyzátor, rozpouštědlo a koncentrace složek. Změna reakčních podmínek umožňuje přípravu chtěného izomeru, jelikož touto reakcí vznikají jak izomer N⁷, tak izomer N⁹, který bývá v dominantním zastoupení. Obecně lze říct ze zvýšená teplota podporuje vznik termodynamického N⁹ produktu, ale nelze univerzálně určit podmínky za kterých

by vznikal určitý izomer.^{72,73} To znamená, jestliže při nějakých reakčních podmínkách vzniká z výchozí látky N⁷ izomer, tak není pravidlem, že při stejných reakčních podmínkách u jiné výchozí látky a alkylačního činidla bude vznikat N⁷ izomer ve stejném výtěžku a konverzi. To je problémem této metody, že ji nelze univerzálně využít.

Jak již bylo zmíněno výše, silylační metody umožňují přípravu glykosidů s dominantním zastoupením N⁹ izomeru. Nicméně mezi silylačními reakcemi se najdou i takové, u kterých se očekávaná regioselektivita snižuje a roste ve prospěch N⁷ izomeru. Příklad takové reakce popisuje reakční schéma 18.⁷⁴

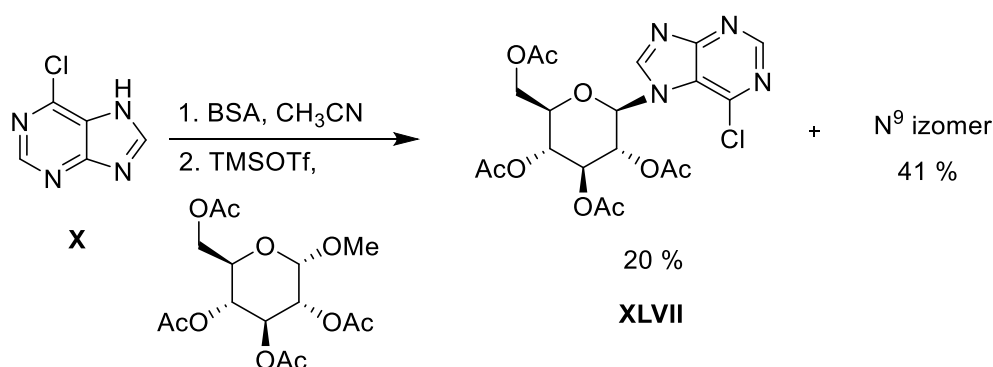


Schéma 18 Glykosylace silylační metodou.

Byla představena metoda, jejíž reakční podmínky umožňují přípravu guaninových N⁷ pentafuranosidů ribózy, xylózy a arabinózy ve výtěžcích až 70 %. Oproti minulým reakcím zde došlo k změně katalyzátoru v podobě Lewisově kyseliny. Byl použit i SnCl₄ a TiCl₄. Další změna nastala i u rozpouštědla, kde byl použit 1,2-dichlorethan. Konkrétní reakce jsou uvedeny ve schématech 19 a 20.⁷⁵⁻⁷⁶ V případě schématu 20 jsou zde popsány první sloučeniny umožňující zavedení alkyly do polohy N⁷ silylační metodou. Tyto alkyly ale mají strukturní podobnost s glykosidy.

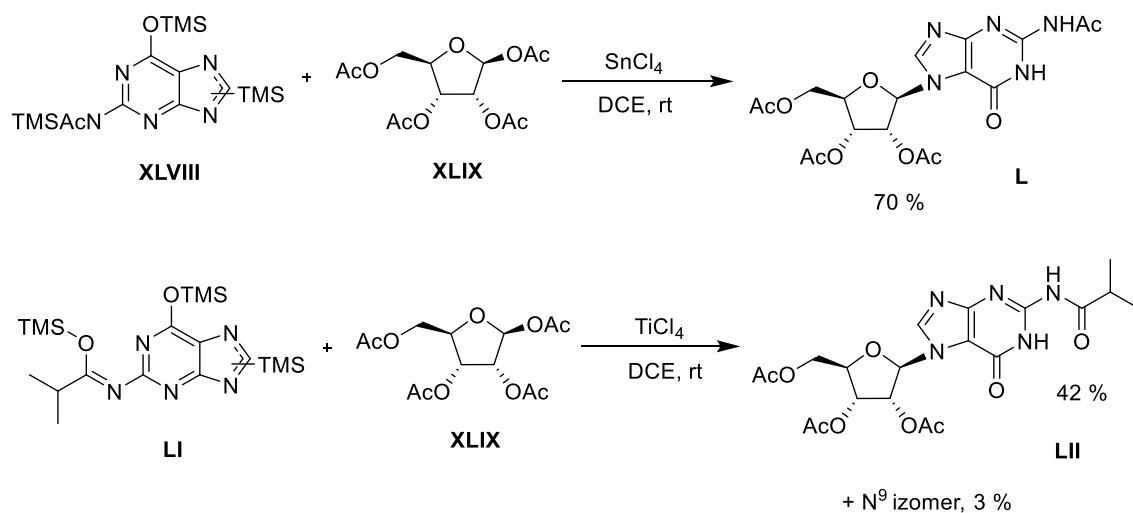


Schéma 19 Příklady silylace.

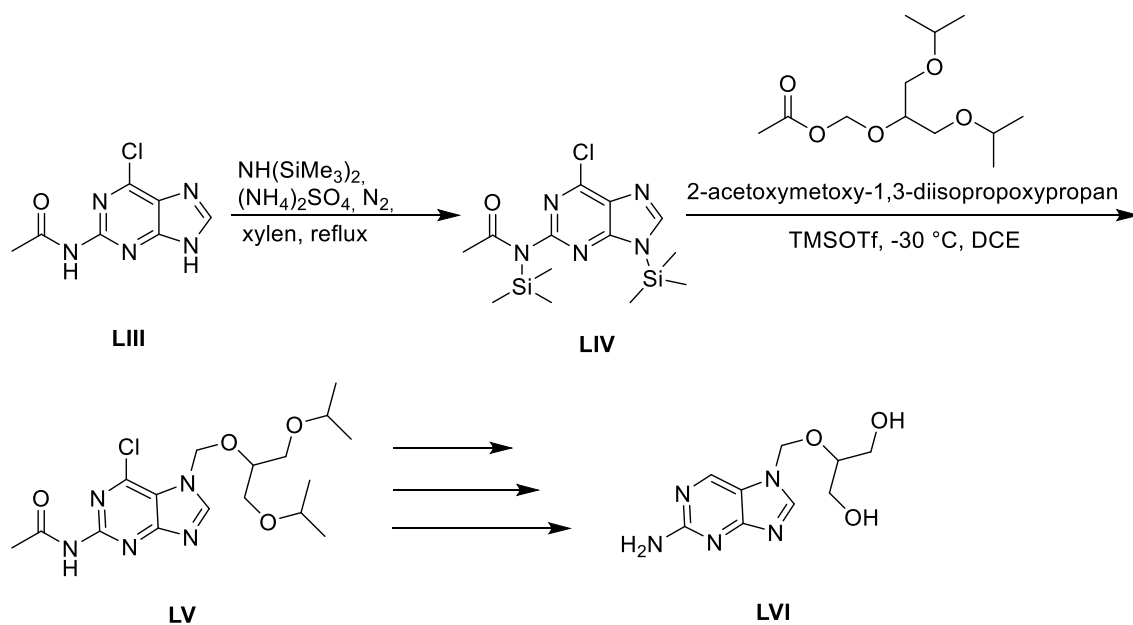


Schéma 20 Alkylace silylační metodou.

2.2.6 Příprava 7-substituovaných purinů alkyací přes puriniové soli

K přípravě 7-substituovaných purinů je možné dospět přes puriniové soli. Princip této méně obvyklé metody je založen na alkylationi N⁹-substituovaných purinů s labilní skupinou alkylačními činidly za vzniku puriniových solí. Ty se pak štěpí na N⁷-puriny. Takto byla jako labilní skupina použita ribosa⁷⁷, acetyl⁷⁸, difenylmethyl⁷⁹, trimethylsilyl⁷⁶ nebo trityl⁸⁰. Omezení těchto reakcí je na reaktivní primární halogenderiváty a v některých případech nutnost štěpení v kyselém prostředí.

Jako ilustrativní příklad je zde uvedena příprava 7-methyl-6-methoxyguaninu **LIX** z 6-methoxyguanosinu **LVII** (Schéma 21).⁷⁷

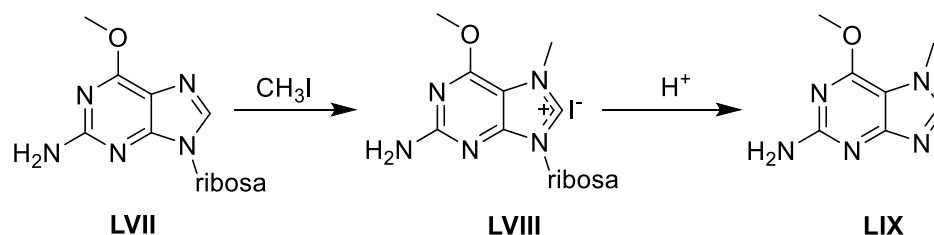
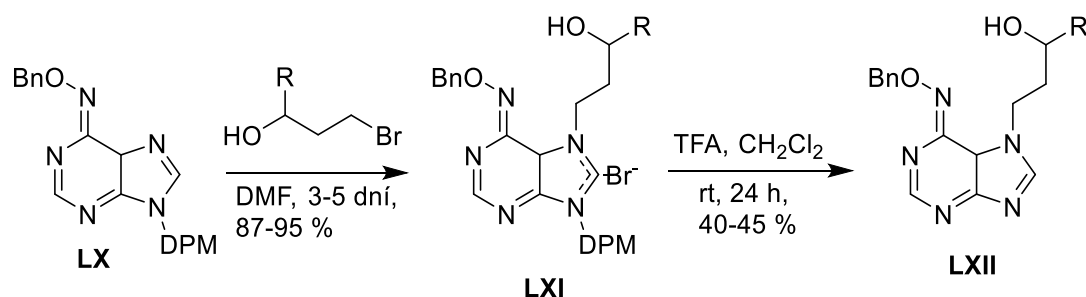


Schéma 21 Reakce přes puriniovou sůl s labilní skupinou ribosy.

Podobný příklad representuje alkylace 9-substituovaného purinu **LX** skupinou DPM (1,2-difenylnmaleyl) 3-bromopropanolem a následné štěpení TFA (Schéma 22).⁷⁹



R = H, Me, heptyl

Schéma 22 Reakce přes puriniovou sůl s labilní skupinou DPM.

Problémem N^7 selektivní substituce zmíněným bez nutnosti použití kyselých štěpících činidel je věnována publikace,⁸¹ kdy N^9 -substituovaný purin skupinou PMB (p-methoxybenzyl) **LXIII** je alkylován trialkyloxonium tetrafluoroborátem (pro R = methyl a ethyl pouze). Následuje pak MW deproteckce (Schéma 23).⁸¹

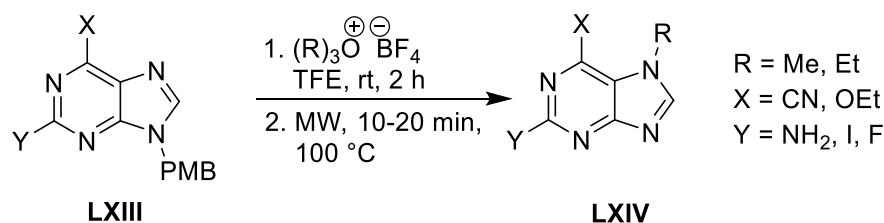


Schéma 23 Reakce přes puriniovou sůl s labilní skupinou PMB.

3 Výsledky a diskuse

Cílem bakalářské práce je připravit deriváty 6-chlorpurinu mající v poloze N⁷ *terc*-butylovou skupinu. Jelikož zavedení terciární skupiny na 6-chlorpurin do polohy N⁷ nebylo doposud v literatuře popsáno, bude úkolem nalézt a propracovat metodu, která umožňuje zavedení *terc*-butylové skupiny do N⁷ polohy 6-chlorpurinu a následně připravit 6-substituované deriváty purinu substitucí atomu chloru v poloze C⁶, které mají v poloze N⁷ *terc*-butylovou skupinu. Připravené deriváty budou otestovány na cytotoxickou aktivitu na vybraných buněčných liniích, respektive aktivitu na CDK a bakteriostatickou aktivitu.

Tato část bude rozdělena do kapitol tak, jak probíhaly experimenty v laboratoři. Nejprve tedy snaha o přípravu N⁷ substituovaných 6-chlorpurinů, přičemž hlavním cílem je zavést terciární alkyl, který doposud nebyl popsán žádnou metodou. V našem případě se jedná o *terc*-butyl. Poté bude následovat kapitola pro optimalizaci vhodné metody. Na závěr bude uvedena kapitola pro syntézu 6-substituovaných-7-(*terc*-butyl)purinů. Snahou bude připravit strukturně odlišné deriváty, které budou mít v poloze C⁶ substituenty vázány přes atom dusíku, kyslíku, uhlíku a síry.

3.1 Aplikace metod popsaných v literatuře pro přípravu N⁷ substituovaných purinů k zavedení terciárního zbytku

Obsahem této kapitoly bude reprodukce metod, které se používají pro zavedení substituentů do polohy N⁷ purinového cyklu popsaných v rešeršní části a jejich aplikace pro zavedení terciárního zbytku.

3.1.1 Metoda umožňující přípravu přes 7,8-dihydropurin chráněný v poloze N⁹-Boc skupinou

Možným přístupem pro syntézu N⁷ substituovaných purinů je ochránění polohy N⁹ Boc skupinou výchozího 6-chlorpurinu **1** s následnou redukcí imidazolového cyklu a alkylací příslušným alkylačním činidlem (viz. kapitola 2.2.2). Bylo vycházeno z článků, které se takovou syntézou zabývají.^{64,65} Uvedený postup, který znázorňuje reakční schéma 24, byl ověřen nejprve pro popsání substrát benzylbromid vedoucí k produktu **5** a následně aplikován pro *terc*-butylbromid.

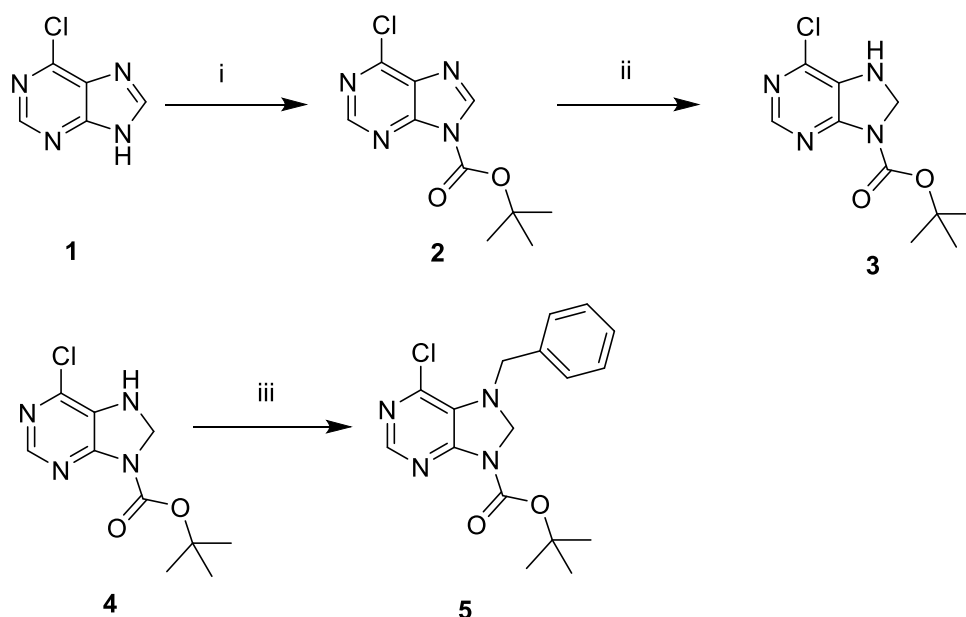


Schéma 24 (i) Boc₂O, DMAP, DCE, r.t., 3 h, 95 %; (ii) THF·BH₃, THF, - 78 °C → 0 °C, 30 min., 94 %; (iii) benzylbromid, LiHMDS, DMF, THF, - 78 °C → r.t., 20 min., 96 %

Ochránění N⁹ polohy skupinou Boc proběhlo v souladu s literaturou⁶⁵ podle návodu s využitím nukleofilního katalyzátoru DMAP (4-(dimethylamino)pyridin). S redukcí připraveného Boc ochráněného 6-CIP (**2**) byl nejprve problém díky nekvalitnímu BH₃·THF. Z LCMS chromatogramu nebylo možné určit, jestli vzniká chtěný produkt číslo **3**. Teprve změřením ¹H-NMR spektra bylo zjištěno, že k redukcí nedochází. Po použití nové chemikálie redukce proběhla s 94 % výtěžkem látky **3**. Následně byla provedena benzylace za popsáných podmínek a získaný benzylovaný produkt **5** byl změřen NMR spektroskopii. ¹H-NMR spektrum se shoduje se spektry uvedených v literatuře.⁶⁴ Rovněž i výtěžek 96 % koresponduje s literaturou (91 %).

Byla provedena analogická reakce s využitím *tert*-butylbromidu. Analýzou zpracované reakční směsi metodou LCMS bylo zjištěno, že se jedná o směs látek, kde jeden pík byl dominantnější. Na základě LCMS analýzy výše ověřené reakce vedoucí k 7-benzyl derivátu **5** u kterého nebylo možné nalézt molekulární iont, jak v kladném ani záporném modu, tak i v tomto případě nebylo možné dle hmotnostního spektra zjistit, zda se jedná o požadovaný *tert*-butyl derivát **29**. Po komplikované chromatografické separaci byla v 90 % čistotě získána bílá látka, která dle LCMS spektra potvrdila přítomnost atomu chloru v molekule a v kladném modu byly také přítomny ionty o hodnotě: 145, 189 a velice slabě intenzivní molekulární iont

o hodnotě 245. V záporném modu byl dominantní pouze jeden molekulární iont o hodnotě 169. Na základě LCMS dat tedy nebylo možné určit o jakou látku se jedná. Z naměřeného $^1\text{H-NMR}$ spektra byly kromě 10 % nečistoty patrné 4 singlety. Dva o integrální intenzitě po jednom vodíku s chemickým posunem 9.44 a 8.03 ppm. Jeden širší signál o integrální intenzitě za 2 vodíky s chemickým posunem 5.46 ppm a jeden za 9 vodíků s chemickým posunem 1.46 ppm. Díky navíc jednomu signálu spektrum neodpovídá požadované struktuře **29** (Schéma 25). V $^{13}\text{C-NMR}$ spektru bylo naměřeno pouze 7 strukturně odlišných atomů uhlíků (viz. příloha Bc. práce, str. 97). Zajímavé bylo, že s časovým rozestupem 2 dnů docházelo k separaci nerozpustné látky v kyvetě za vzniku směsi 2 látek: výchozí látka a nový produkt, který se projevoval v $^1\text{H-NMR}$ spektru navíc třemi singlety o chemickém posunu: 12.14, 11.7 ppm svědčící dvěma kyselým vodíkům a signálu 8.34 ppm. Zároveň byl v kyvetě pozorován přibývající *tert*-butanol (singlet 1.1 ppm a široký signál při 4.2 ppm ve vzájemném poměru 9/1) (viz. příloha Bc. práce, str. 98). Bylo jasné, že výchozí látka se ve zmíněný produkt mění za uvolnění *tert*-butanolu. Úplná konverze byla dosažena zahřátím kyvety na 70 °C po dobu 24 hodin, která domněnku potvrdila (viz. příloha Bc. práce, str. 99). V produktu pak bylo 5 strukturně odlišných atomů uhlíku. A jeho HRMS hodnota v kladném modu (171,0070) naznačovala, že se jedná o produkt o sumárním vzorci $\text{C}_5\text{H}_3\text{ClN}_4\text{O}$. Vzhledem k výše uvedeným faktům lze konstatovat, že produktem reakce 9-Boc-7,8-dihydro-6-chlorpurinu (**4**) s *tert*-butylbromidem musí být překvapivě ochráněný aminopyridin **6**, který pak podléhá intramolekulární cyklizaci za vzniku 4-chlor-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-onu (**7**).

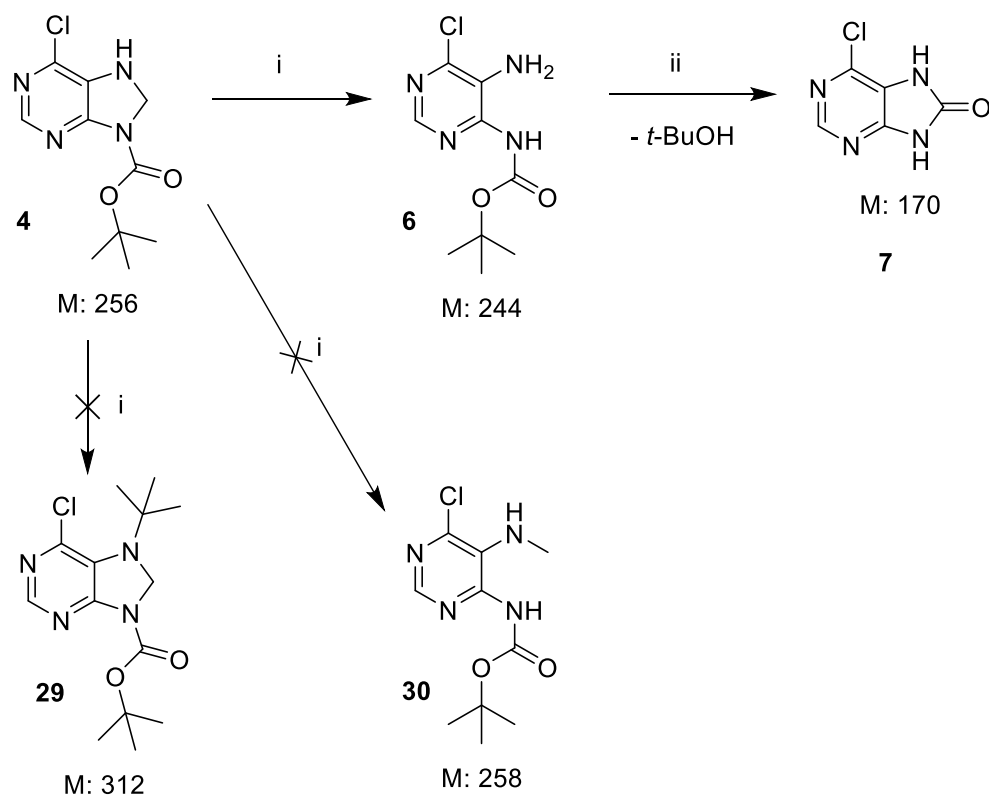


Schéma 25 (i) LiHMDS, *t*-BuBr, DMF, THF, - 78 °C → r.t., 20 min., 12 % (ii) DMSO, 70 °C, 24 h

Je zajímavé, že látka **6** z 9-Boc-7,8-dihydro-6-chlorpurinu (**4**) v prostředí bis(trimethylsilyl)amidu lithného (LiHMDS) vzniká. Otevření imidazolinového cyklu za vzniku *N*-methyl derivátu **30** by bylo snadněji vysvětlitelné (viz. analogie⁶³), než současná *N*-demethylace za vzniku látky **6**.

Následně pro ověření, jestli při reakci hraje roli *t*-BuBr byla reakce zopakována bez alkylačního činidla a bylo zjištěno, že opět vzniká na LCMS chromatogramu stejný pík se stejným retenčním časem a stejným hmotnostním spektrem. Z toho plyne, že *t*-BuBr se reakce neúčastní a tato metoda není vhodná pro zavedení terciárního zbytku.

3.1.2 Alkylační metoda s využitím Grignardového činidla

Další reakcí, která byla zvolena pro zavedení *tert*-butylu do polohy N⁷ byla reakce využívající Grignardovo činidlo. Grignardovo činidlo způsobí deprotonaci a anion delokalizovaný mezi N⁷ a N⁹ reaguje s příslušným alkylhalogenidem za vzniku směsi N⁷ a N⁹ izomerů, kde v závislosti na reakčních podmínkách, zejména typu použitého Grignardova činidla, lze N⁹ izomer výrazně potlačit.⁸² Použili jsme tuto metodu popsanou v literatuře a aplikovali jsme ji na přípravu chtěného 7-(*tert*-butyl)-6-

chlorpurinu (**9**). V původní literatuře byla popsána reakce pouze pro primární resp. sekundární alkyhalogenidy, bylo proto zajímavé ji ověřit pro terciární alkyl.

Metoda byla nejprve ověřena v literatuře popsanou reakcí 6-chlorpurinu (**1**) s benzylbromidem v bezvodém THF. Jako Grignardovo činidlo bylo zvoleno podle literatury MeMgCl. Reakce probíhala 20 hodin při teplotě 50 °C. Průběh reakce je znázorněn ve schéma 26.

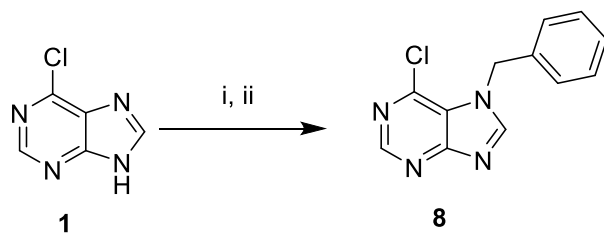


Schéma 26 (i) MeMgCl, THF, r.t., 30 min. (ii) benzylbromid, 50 °C, 20 h, 65 %

Výtěžek produktu **8** byl po chromatografické separaci 65 % ve srovnání s literaturou⁸² je o 23 % menší (88 %). Naměřené ¹H-NMR spektrum v DMSO bylo srovnáno s literaturou⁸² a lišilo se chemickým posunem pouze pro aromatické vodíky. Jelikož ¹³C-NMR spektrum odpovídalo literatuře, tak bylo usouzeno, že jsme na dobré cestě. Publikovaná číselná data pro ¹H-NMR spektrum látky **8** byla srovnána s obrázkem spektra z téže literatury a bylo zjištěno, že chemické posuny pro aromatické vodíky v obrázku se neshodují s číselnými daty uvedenými v příloze literatury. Po srovnání námi naměřených dat pro ¹H-NMR spektrum s obrázkem spektra z literatury se již data úplně shodovala. Číselná data byla srovnána i s jiným článkem⁶³, kde byl stejný produkt **8** připraven. V tomto případě autor uváděl, že ¹H-NMR spektrum bylo změřeno v DMSO, jako v našem případě, ale ve skutečnosti se jednalo o překlep a bylo autory článku změřeno v chloroformu.

Na základě úspěšně zvládnuté reprodukce popsané reakce byla metoda aplikována pro zavedení *tert*-butylbromidu do polohy N⁷ s pomocí MeMgCl. Ze začátku byly zvoleny stejné reakční podmínky. Po 20 hodinách při 50 °C však nedošlo ke konverzi a v reakční směsi byla pouze výchozí látka, což bylo zjištěno na základě TLC. Poté byla teplota zvednuta na 70 °C a reakční směs byla míchána dalších 24 hodin. Průběh reakce je znázorněn ve schéma 27. Po změření vzorku metodou LCMS se ukázalo, že ani změnou reakčních podmínek produkt **9** nevzniká. Tím pádem ani tato metoda není vhodná pro zavedení terciární skupiny.

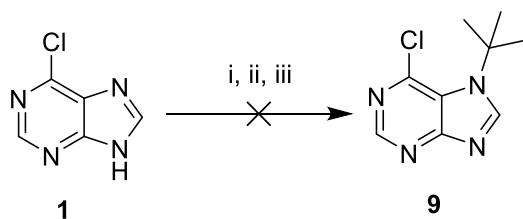


Schéma 27 (i) MeMgCl (1,1 eq.), THF, r.t., 30 min. (ii) *tert*-butylbromid (3 eq.), 50 °C, 20 h; (iii) 70 °C, 24 h

3.1.3 Metoda přímé alkylace

Pro syntézu N⁷-substituovaných purinů lze využít i přímou alkylaci, kdy reaguje příslušný purin s alkylačním činidlem, jako jsou halogenderiváty v přítomnosti běžné báze jako je např. uhličitan draselný. Tyto reakce byly i v tomto případě popsány pouze pro primární a sekundární alkyly (viz. kapitola 2.2.1). Během reakce vznikají N⁷ a N⁹ izomery s převahou N⁹ izomeru, jelikož se jedná o termodynamický produkt a v případě N⁷ izomeru o kinetický produkt.

Reakce byla opět otestována pro benzylbromid, který reagoval s 6-chlorpurinem (1 mmol) (**1**) v přítomnosti K₂CO₃ při laboratorní teplotě 20 hodin, jak je znázorněno ve schéma 28.

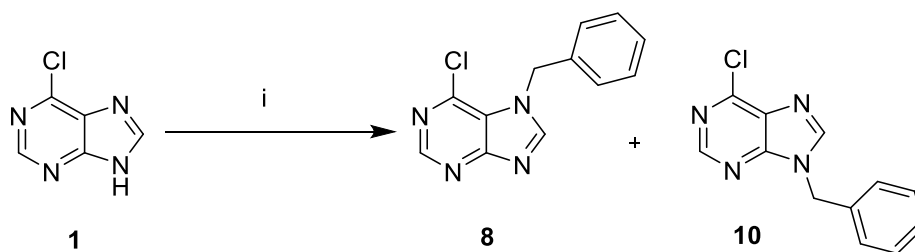
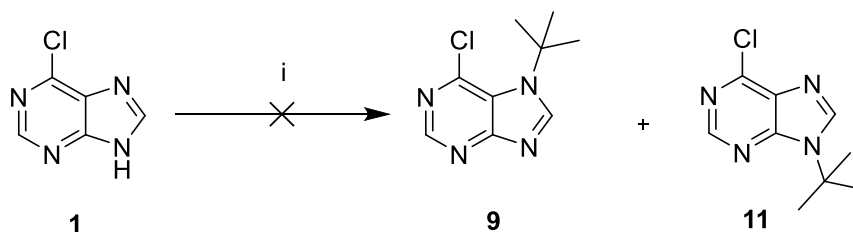


Schéma 28 (i) benzylbromid, K₂CO₃, DMF, r.t., 20 h

Po LCMS měření byly vidět na chromatogramu 2 píky s rozdílným retenčním časem a se stejnou molekulovou hmotností odpovídající produktu. Jeden pík pro N⁷ izomer **8** a druhý s vyšším retenčním časem pro N⁹ izomer **10** v poměru 1/2,4 (N⁷/N⁹). Konverze výchozí látky byla 70 %.

Následně byla reakce opět použita pro zavedení *tert*-butylu, místo K₂CO₃ byl rovnou použit NaH, jako rozpouštědlo bylo použito DMF a jako alkylační činidlo *tert*-butylbromid. Reakce probíhala nejprve za původních podmínek při laboratorní teplotě. Po 20 hodinách byla reakční směs analyzována metodou LCMS a ukázalo se, že

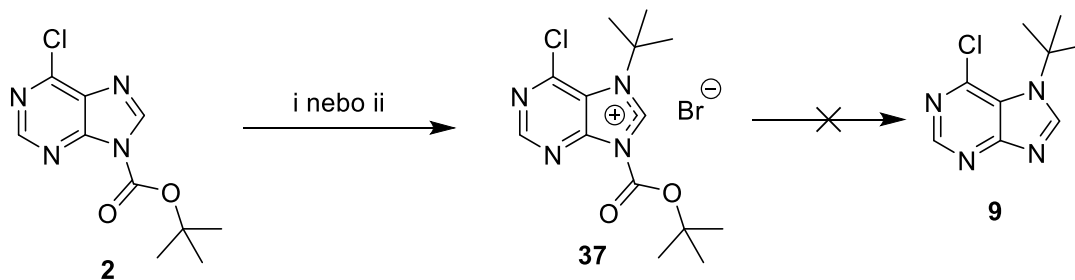
k žádné reakci nedochází. Reakce byla tedy nechána přes víkend (dalších 48 hodin) a ani poté nedošlo k reakci. Reakční směs byla následně ještě zahřívána na 70 °C po dobu 72 hodin a ani potom nedošlo k reakci. Dále zvyšovat teplotu nemělo smysl z důvodu eliminační reakce *tert*-butylbromidu za vzniku 2-methylpropenu a uvolnění bromovodíku. Z toho plyne, že tato metoda také není vhodná pro zavedení *tert*-butylu do purinového skeletu, což se zde víceméně očekávalo (Schéma 29). V literatuře⁶⁸ byl popsán N⁹ *tert*-butyl izomer **11**, který byl však připraven cyklizační metodou (viz. schéma 14).



3.1.4 Příprava 7-substituovaných purinů alkyací přes puriniové soli

Tato méně obvyklá metoda spočívá v alkylationi N⁹ substituovaných purinů s labilní skupinou alkylačními činidly za vzniku puriniových solí, které lze štěpit na N⁷ puriny (viz. kapitola 2.2.6).

Byly provedeny reakce vycházející z dříve připraveného a ochráněného 6-chlorpurinu v poloze N⁹ Boc skupinou **2**, který byl alkylován *tert*-butylbromidem (Schéma 30).



Tabulka 2 Alkylace přes puriniové soli

pokus	solvent	po 1 h *	po 3 h *	po 20 h *
1	DMF	bez reakce	bez reakce	bez reakce
2	ACN	minoritní N ⁹ izomer	minoritní N ⁹ izomer	minoritní N ⁹ izomer

* dle LCMS analýzy

V případě pokusu 1 kdy reakce probíhala v DMF, tak k žádné reakci nedocházelo. V případě použití rozpouštědla ACN však vznikl v minoritním množství nejpravděpodobněji N⁹ izomer **11** (jeho retenční čas se lišil od dříve připraveného N⁷ izomeru **9**). Z toho důvodu nebyla tato metoda vhodná pro zavedení *tert*-butylu do polohy N⁷.

3.1.5 Silylační metoda

Jedná se o metodu, známou jako Vorbgüggenova, která se používá v purinové chemii převážně k zavedení glykosylů zejména do polohy N⁹, ale někdy i do polohy N⁷. Během diplomové práce Bc. Lenky Tranové, která se zabývala regioselektivní N⁷ glykosylací purinových derivátů bylo okrajovým experimentem zjištěno, že je možné selektivní zavedení *tert*-butylu do N⁷ polohy 6-chlorpurinu silylační metodou⁸³, jak je znázorněno ve schématu 31. Postup byl následující.: Silylace 6-chlorpurinu probíhá za inertních podmínek. Jako Lewisova kyselina byla zvolena SnCl₄. 6-CIP (1 mmol) byl nejprve silylván pomocí BSA (1,5 eq.) v 1,2-dichlorethanu (10 ml) při 80 °C. Poté byl roztok ochlazen na 0 °C a byl přidán SnCl₄ (2,1 eq.) a nakonec *tert*-butylbromid (1,5 eq.) při laboratorní teplotě. Reakce probíhá 20 hodin za laboratorní teploty s uváděným výtěžkem okolo 50 %.

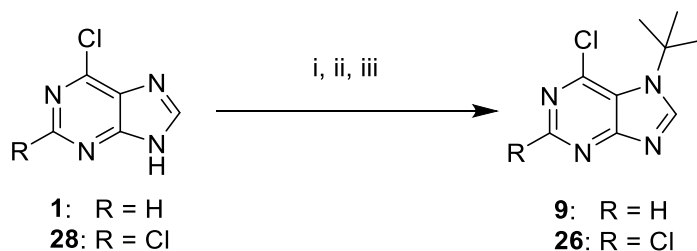


Schéma 31 Reakční schéma pro původní reakční podmínky. (i) BSA (1,5 eq.), DCE, 80 °C, 30 min., (ii) SnCl₄ (2,1 eq.), 0 °C → r.t., 30 min., (iii) *tert*-butylbromid (1,5 eq.), r.t., 20 h

Touto klíčovou, doposud v odborné literatuře nepopsanou reakcí se bylo dále zabýváno ve snaze jejího hlubšího probádání, kde byl důraz kladen na zvýšení výtěžku a vyšší aplikovatelnosti pro jiné substráty a typy alkylačních činidel.

Metoda byla nejprve reprodukována se stejnými podmínkami. Byl získán N⁷ izomer 6-chlor-7-(*tert*-butyl)purin (**9**) s výtěžkem 40 %. Reakce byla následně provedena i s deseti násobným množstvím a výtěžek byl opět kolem 40 % (42 %). Bylo zjištěno, že ne příliš vysoké výtěžky jsou způsobeny nedostatečnou konverzí (47 %) 6-CIP za daných podmínek.

Stejně reakční podmínky byly aplikovány i pro přípravu 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**26**) s izolovaným výtěžkem 13 %. Zde byl důvod ověření reakce i na jiném substrátu, než byl 6-chlorpurin (Schéma 31). Tato sloučenina **26** byla již popsána v literatuře. Byla však připravena na jiném principu a navíc ve směsi s N⁹ izomerem. NMR spektra připraveného N⁷ izomeru **26** odpovídala publikovaným datům.⁸⁴

3.1.5.1 Vliv Lewisových kyselin na reakci

Jelikož jsou silylační reakce popisovány hojně i s TiCl₄, tak jsme se rozhodli metodu otestovat s původními reakčními podmínkami, ale s obměnou zmíněné Lewisovy kyseliny, nicméně výtěžek za použití TiCl₄ byl pouze 21 %. Nízký výtěžek byl opět způsoben nedostatečnou konverzí výchozí látky.

Rozhodli jsme se použít i další Lewisovy kyseliny dostupné v laboratoři s tím, že byly zvoleny původní reakční podmínky jako s SnCl₄. Testovací reakce byly prováděny s 0,5 mmol 6-CIP. Průběh reakcí je znázorněn v tabulce 3.

Tabulka 3 Použití Lewisových kyselin

pokus	Lewis. kys. (2,1 eq.)	TLC po 24 h/r.t.	LCMS po 72 h/r.t. (konverze)*	TLC po 120 h (posledních 48 h při 70 °C)
1	AlCl ₃	bez reakce		bez reakce
2	ZnCl ₂	náznak produktu	zanedbatelná***	náznak produktu
3	FeCl ₃	náznak produktu	zanedbatelná***	náznak produktu
4	Ti(<i>i</i> PrO) ₄	bez reakce		bez reakce
5	BF ₃ ·Et ₂ O	bez reakce		bez reakce
6	TMSOTf	bez reakce		bez reakce
7	TiCl ₄		51 %**	

* hodnoty z LCMS analýzy, ** po 18 hodinách, *** minoritní produkty **9** identifikované dle retenčního času metodou LCMS

Z provedených reakcí vyplývá, že žádná ze zvolených Lewisových kyselin není vhodná pro zavedení *tert*-butylu silylační metodou. Kromě TiCl₄, který způsoboval nižší výtěžek způsobený nedostatečnou konverzí.

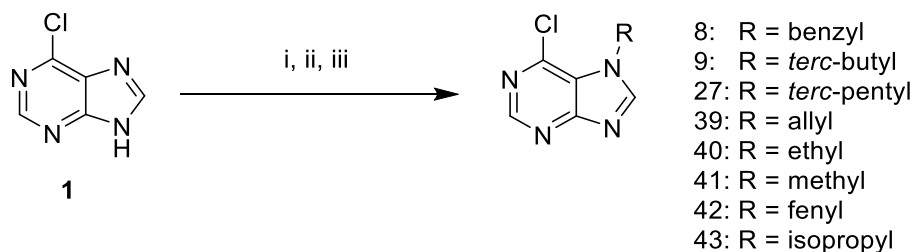


Schéma 32 Obecné schéma pro změny reakčních podmínek: (i) BSA, rozpouštědlo, 80 °C, 30 min., (ii) Lewisova kyselina, 0 °C → r.t., 30 min., (iii) alkylační činidlo (RX), r.t., 20 h

3.1.5.2 Testování silylační reakce s jinými typy halogenderivátů

Silylační metoda, za původních podmínek (viz. Schéma 31), byla otestována i pro zavedení primárních alkylů do polohy N⁷ (nyní zobecněno do Schéma 32). Byla zvolena alkylační činidla, která a) svým obecným substitučním mechanismem byla podobná k *tert*-butylbromidu (benzylbromid, allylbromid) b) byla jinak dostatečně reaktivní (ethyljodid, methyljodid). Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulce 4. Nejprve bylo provedeno TLC po 20 hodinách, které u všech pokusů ukázalo dominantní skvrnu pro

výchozí látku **1**. Pouze u allylbromidu a benzylbromidu byl náznak konverze za vzniku minoritního produktu. V případě benzylu bylo prokázáno, že se jedná o přítomnost pouze N⁷ izomeru **8** tak, že byla srovnána data LCMS s N⁷ benzylem **8** připraveným za použití Grignardového činidla (viz. kapitola 3.1.2), který byl popsán v literatuře⁸² a prokázán na základě NMR. Porovnaná data se shodovala v retenčním čase i hodnotou molekulárního iontu pro identický produkt. Dále bylo zjištěno, že během dalšího zahřívání na 80 °C došlo k odštěpení benzylu a tím i vymizení produktu za vzniku 6-CIP. Což je pravděpodobně z důvodu, že látka je nestabilní v prostředí s SnCl₄ při vyšší teplotě, jak se analogicky ukázalo i při testování stability samotného 7-(*tert*-butyl)-6-chlorpurinu (**9**) v přítomnosti SnCl₄ (viz. kapitola 3.3.1).

Tabulka 4 Použití primárních alkylačních činidel

pokus	alkylační činidlo	konverze po 20 h*	konverze po 44 h* (posledních 24 h při 80 °C)
1	BnBr	1,4/1**	benzyl se odštěpil
2	Allylbromid	zanedbatelná	minoritní produkt setrval
3	EtI	žádná	
4	MeI	žádná	

* hodnoty z LCMS analýzy, ** výchozí látka **1** / produkt **8**,

Závěrem pokusů je zjištění, že silylační metodu za daných podmínek nelze využít pro alkylaci primárními halogenderiváty. N⁷ produkt **8** vznikal pouze v případě benzylbromidu, ale se špatnou konverzí. Nicméně tato reakce alespoň potvrdila regioselektivitu silylační metody za daných podmínek do polohy N⁷.

Pro detailnější ověření metody byla silylační metoda otestována i pro sekundární alkylační činidlo isopropylbromid a pro aromatický halogenderivát brombenzen. Průběh pokusů je uveden v tabulce 5. Jelikož tyto reakce byly provedeny dodatečně, až po optimalizaci této metody, tak byl použit 3 eq. alkylačního činidla namísto původních 1,5 eq. a rozpouštědlo acetonitril, ve kterém reakce probíhá rychleji.

Tabulka 5 Použití sekundárních alkylačních činidel

pokus	alkylační činidlo	konverze po 3 h**	konverze po 19 h**	konverze po 21 h (2 h při 80 °C)**
1*	brombenzen	žádná	žádná	žádná
2*	isopropylbromid	žádná	žádná	

* reakce vedeny v ACN, ** hodnoty z LCMS analýzy

Reakce za laboratorní teploty však neprobíhají. Na 80 °C byl ve snaze podpořit reakci zahříván pouze pokus s brombenzenem, jelikož zavedené benzenového jádra by mohlo vést k větší prokonjugovanosti teoreticky vznikajícího produktu **42** a tím i zvýšení jeho stability. Nicméně to bylo neúspěšné.

Posledními testovacími pokusy pro silylační metodu bylo ověření této metody i pro jiný terciární alkyl a tím potvrdit specifitu silylační metody, umožňující regioselektivní zavedení alifatického terciárního substituentu do polohy N⁷ 6-CIP. Pro tyto účely byl zvolen 2-brom-2-methylbutan. Ve snaze ověřit i typ halogenu na vliv již prozkoumané reakce byl *tert*-butylbromid vyměněn za *tert*-butylchlorid. V tabulce 6 jsou znázorněna použitá rozpouštědla, alkylační činidla a reakční časy, u kterých je znázorněna konverze výchozí látky **1** na produkt (**27** v případě použití 2-brom-2-methylbutanu, **9** v případě použití *tert*-butylchloridu). Jelikož tyto reakce byly provedeny dodatečně, až po optimalizaci této metody, tak byl použit 3 eq. alkylačního činidla.

Tabulka 6 Použití terciárních alkylačních činidel

pokus	solvent	alkyl. č.	3 h*	22 h*	40 h*
1	DCE	2-bromo-2-methylbutan		1,3/1	1,3/1
2	DCE	<i>tert</i> -butylchlorid		1/2,5	1/2,5
3	ACN	2-bromo-2-methylbutan	1,6/1	1,6/1	
4	ACN	<i>tert</i> -butylchlorid	1/3	1/3	

* výchozí látka **1** / produkt, hodnoty z LCMS analýzy

Z provedených reakcí je vidět, že silylační metodu lze použít i pro jiná terciární alkylační činidla. V porovnání *t*-BuCl s *t*-BuBr dochází ale k mnohem menší konverzi.

Po 22 hodinách v DCE za stejných podmínek dochází v případě *t*-BuBr ke konverzi (1/6,6), kdežto u *t*-BuCl (1/2,5). V porovnání 2-bromo-2-methylbutanu s *t*-BuBr je konverze v DCE ještě nižší (1,3/1). Po 22 hodinách převažuje v reakční směsi stále výchozí látka. V acetonitrilu vznikaly produkty v podobném poměru již po 3 hodinách. 6-Chlor-7-(*tert*-pentyl)-7*H*-purin (**27**) (dle pokusu 1 v tabulce 6) byl připraven i preparativně s izolovaným výtěžkem 35 %.

3.1.5.3 Optimalizace silylační metody

Jak již bylo řečeno na začátku popisu silylační metody, tak původní podmínky poskytují 40 % výtěžek 7-(*tert*-butyl)-6-chlorpurinu (**9**). Proto jsme se rozhodli pro optimalizaci reakčních podmínek ve snaze výtěžek zvýšit. Byl testován vliv rozpouštědla a různé ekvivalenty SnCl₄ a alkylačního činidla, a to i v závislosti na teplotě, jak je uvedeno v tabulce 7. Všechny reakce pro optimalizaci vycházely z 0,25 mmol 6-CIP; 2,5 ml rozpouštědla a 1,5 eq. BSA. Reakce byly dělány v uzavřených vialkách za inertních podmínek.

Tabulka 7 Optimalizace reakčních podmínek 1

pokus	solvent	SnCl ₄	<i>t</i> -BuBr	reakční čas	teplota	výchozí l. (1) / produkt (9) *
1 (původní podmínky)	DCE	2,1 eq.	1,5 eq.	3 h	r.t.	1,27/1
				19 h		1,13/1
				5 dnů		1,26/1
2	DCE	2,1 eq.	1,5 eq.	3 h	50 °C	1,25/1
				19 h		1/3,6
				5 dnů		4,1/1
3	DCE	1,2 eq.	1,5 eq.	3 h	r.t.	8,66/1
				19 h		1,38/1
				5 dnů		1/1,25
4	DCE	1,2 eq.	3 eq.	3 h	r.t.	4,3/1
				19 h		1/1,6
				5 dnů		1/5,1
5	DCE	3 eq.	1,5 eq.	3 h	r.t.	1,56/1
				19 h		1/1
				5 dnů		bez produktu
6	DCE	2,1 eq.	3 eq.	3 h	r.t.	1/3,43
				19 h		1/3
				5 dnů		1/7,5
7	DCE	/	3 eq.	3 h	r.t.	nereaguje
				19 h		nereaguje
				5 dnů		nereaguje
8	DCE	1 eq.	1 eq.	3 h	r.t.	zanedbatelná
				19 h		5,6/1
				5 dnů		2/1
9	ACN	2,1 eq.	1,5 eq.	3 h	r.t.	1/1,6
				19 h		1/1,7
				5 dnů		1/2,2

* hodnoty z LCMS analýzy

Srovnáním s pokusem 1 byly z provedených experimentů vyhodnoceny jako nejlepší experimenty 6 a 9. V případě pokusu 6 dochází k dobré konverzi po 19 hodinách zvýšením množství alkylačního činidla. Pokus 9 byl proveden v ACN již během 3 hodin se zajímavou konverzí, kde navíc byla pozorována i větší rychlost reakce. Je tedy zřejmé, že 2,1 eq. SnCl₄ je dostačující a je třeba použít více alkylačního činidla (3 eq.), což bylo provedeno v pokusu 2/tabulky 8. V případě pokusu 2 bylo pozorováno, že i zvýšení teploty vedlo po 19 h k lepší konverzi, ale dramaticky se změnila po 5 dnech. U pokusů 3 a 4 snížením množství SnCl₄ vedlo ke snížení konverze, proto je nutné použít 2,1 eq. SnCl₄. Zajímavé bylo vymizení produktu po 5 dnech u pokusu 5 kde bylo použito větší množství SnCl₄ v poměru s alkylačním činidlem. Ani konverze výchozí látky po 19 hodinách nebyla dostatečná (1/1). Z pokusu 7 je vidět, že bez použití SnCl₄ reakce neprobíhá ani v případě dlouhé reakční doby. Použitím malého množství (1 eq.) SnCl₄ a alkylačního činidla (1 eq) u pokusu 8 vedlo k nedostatečné konverzi i v případě dlouhé reakční doby. U pokusu 4 po 5 dnech vznikl i jiný izomer než N⁷.

Tabulka 8 Optimalizace reakčních podmínek 2

pokus	solvent	SnCl ₄	<i>t</i> -BuBr	reakční čas	teplota	Konverze** výchozí l. (1) / produkt (9)
1*	DCE	2,1 eq.	3 eq.	3 h	r.t.	1/3
				18 h		1/6,6
				5 dnů		1/11,9
2	ACN	2,1 eq.	3 eq.	3 h	r.t.	1/8,3
				18 h		1/8
				5 dnů		1/5
3	DCE	2,1 eq.	1,5 eq.	3 h	50 °C	1,75/1
				18 h		1/1,9
				5 dnů		odštěpení <i>t</i> -butylu
4	ACN	2,1 eq.	3 eq.	3 h	50 °C	1/1,2
				18 h		směs 4 izomerů
				5 dnů		dominantní N ⁹ izomer

* stejné podmínky jako pokus 6 z minulé tabulky 7, ** hodnoty z LCMS analýzy

Průběh opakovaného pokusu 6 z předchozí tabulky 7 za laboratorní teploty odpovídal zhruba předchozímu pozorování, což sloužilo pro ověření nových nadějnějších podmínek z pohledu výtěžku (nyní jako pokus 1/tabulka 8). Modifikovaný pokus 9 z předchozí tabulky 7 poskytl použitím dvojnásobného množství alkylačního činidla ještě lepší konverzi (nyní jako pokus 2/tabulka 8). Dále z provedených experimentů bylo pozorováno, že v případě použití acetonitrilu při zvýšené teplotě dochází po 18 hodinách ke vzniku i jiných izomerů než N⁷ izomeru se stejnou hodnotou molekulárního iontu, kdy dva nové izomery spolu s N⁷ izomerem s časem vymizely a po 5 dnech v reakční směsi dominoval (kromě taky přítomného 6-CIP) pouze jeden nový nejpravděpodobněji nejstabilnější N⁹ izomer (pokus 4/tabulka 8). I v případě, že reakční směs s acetonitrem nebyla zahřívána, tak vznikají náznaky zmíněných izomerů, jejichž množství se s časem zvyšuje, takže jak teplota, tak i reakční doba zde hraje zásadní roli. Opakováním pokusu 2 z předchozí tabulky 7 bylo opět pozorováno, jako v předchozím případě, že za zvýšené teploty (50 °C) po 5 dnech v DCE došlo k odštěpení *terc*-butylu ze vzniklého izomeru **9** z polohy N⁷ a v reakční směsi se nacházel pouze 6-CIP (nyní jako pokus 3/tabulka 8). Zároveň nedošlo ani k tvorbě jiných izomerů, což je zásadní rozdíl mezi použitými rozpouštědly.

Jako nejlepší reakční podmínky pro budoucí přípravu látky **9** ve větším měřítku byly vyhodnoceny u experimentu 1/tabulky 8 s reakční dobou 18 hodin a podmínky experimentu 2/tabulky 8, které dávají tu výhodu, že reakce proběhne již po 3 hodinách, ale vznikají minoritně již i jiné izomery.

Reakční podmínky z experimentů 1 a 2/tabulky 8 byly otestovány z analytických 0,25 mmol 6-CIP pro preparativní dvacetinásobné množství reakčních komponent což je 5 mmol 6-CIP. Reakce probíhaly standardně, jako je popsáno na úvodu silylační metody. Reakce v 1,2-dichlorethanu probíhala 19 hodin s konverzí 1/6,3. Reakce v acetonitrilu probíhala 3 hodiny s konverzí 1/10,2, přičemž vznikalo zmíněné zanedbatelné množství jiného izomeru. Při zpracování reakční směsi bylo zjištěno, že opakovanou extrakcí s NaHCO₃ se lze i efektivně zbavit výchozí látky **1**. V obou případech, tedy za použití ACN i DCE se výtěžky po optimalizaci pohybují od 75 do 78 %.

Lze shrnout, že reakce probíhající v acetonitrilu za laboratorní teploty umožňuje přípravu surového 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu **9** v čistotě 98 % za relativně krátkou

dobu s výskytem jiného izomeru v množství cca 1 % a to bez chromatografické separace či krystalizace, což je její velkou výhodou. Naopak reakce v DCE probíhá sice déle, ale vzniká ve srovnatelném výtěžku, rovněž bez čištění, velice čistý produkt, který ale navíc vedlejší izomer neobsahuje. Uváděny jsou čistoty z $^1\text{H-NMR}$ spektra.

Produkt 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurin **9** byl dále připraven ještě ve větším množství, jelikož sloužil k následujícím substitucím. Postup byl shodný s optimalizovanými podmínkami experimentu 1/tabulky 8, kdy se vycházelo z 5 g 6-ClP (32 mmol). Výtěžek reakce byl 4,7 g; 69 %.

3.2 Identifikace struktury 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu (**9**)

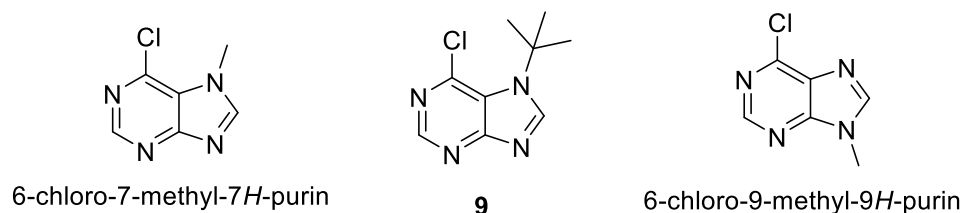
Jelikož látka 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurin nebyla doposud v literatuře popsána, bylo nutné prokázat, že *terc*-butyl je skutečně v poloze N^7 , což se zatím jednoznačně podařit nedokázalo. Z 2D NMR spekter, které byly měřeny mimo Bc. práci toto nebylo možné určit. Nicméně řada nepřímých důkazů všemu nasvědčuje, že se jedná o N^7 izomer.

LCMS analýza prokázala v kladném modu pouze jeden pík o hodnotě molekulárního iontu 211, což odpovídá, že v molekule 6-chlorpurinu *terc*-butyl je navázán. Dalším důkazem bylo měření HRMS, čímž byla získána přesná molekulová hmotnost $(\text{M}+1)^+ = 211.0746$ a z ní vygenerován sumární vzorec ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Cl}_1\text{N}_4$). Dále bylo srovnáno $^1\text{H-NMR}$ spektrum a teplota tání získané látky **9** s izomerním N^9 derivátem **11** popsaným v literatuře⁶⁸. $^1\text{H-NMR}$ spektrum bylo rozdílné a to v řádu desetin ppm. Bohužel literatura $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum neuvádí. Teplota tání získané látky **9** je 194 - 195 °C a popsaného N^9 derivátu 144 - 146 °C. Z porovnaných dat s literaturou je zřejmé, že se jedná o rozdílné sloučeniny a N^9 izomer to tedy být nemůže.

Pro ještě větší dotvrzení bylo srovnáno $^{13}\text{C-NMR}$ spektrum látky **9** se spektry analogických N^7 a N^9 derivátů majících v těchto polohách methyl, které byly popsány v literatuře^{82,85}. Srovnání je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9 $^{13}\text{C-NMR}$ spektra porovnávaných látek v DMSO

derivát	chemický posun v $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)						
N^7 -methyl ⁸²	161.37	151.44	151.27	142.41	122.69		33.9
N^7 - <i>terc</i> -butyl (9)	163.50	151.10	149.15	141.77	122.67	58.82	30.45
N^9 -methyl ⁸⁵	152.65	151.82	149.21	148.49	131.08		30.57



Obrázek 4 Struktury porovnávaných látek v tabulce 9

Z tabulky 9 je patrné, že chemické posuny se shodují více s N⁷-methyl derivátem, hlavně v případě C⁵ uhlíku, který je označen tučně. Naopak v případě N⁹-methyl derivátu je shoda pouze se dvěma purinovými uhlíky, což opět potvrzuje, že by se mělo jednat o N⁷ derivát.

K jednoznačnému určení struktury by bylo potřeba provést rentgenostrukturní analýzu, při které by byl potřeba dostatečně velký monokrystal. Na tomto úkolu se teď pracuje.

3.3 Stabilita připraveného 7-(*tert*-butyl)-6-chlorpurinu (**9**)

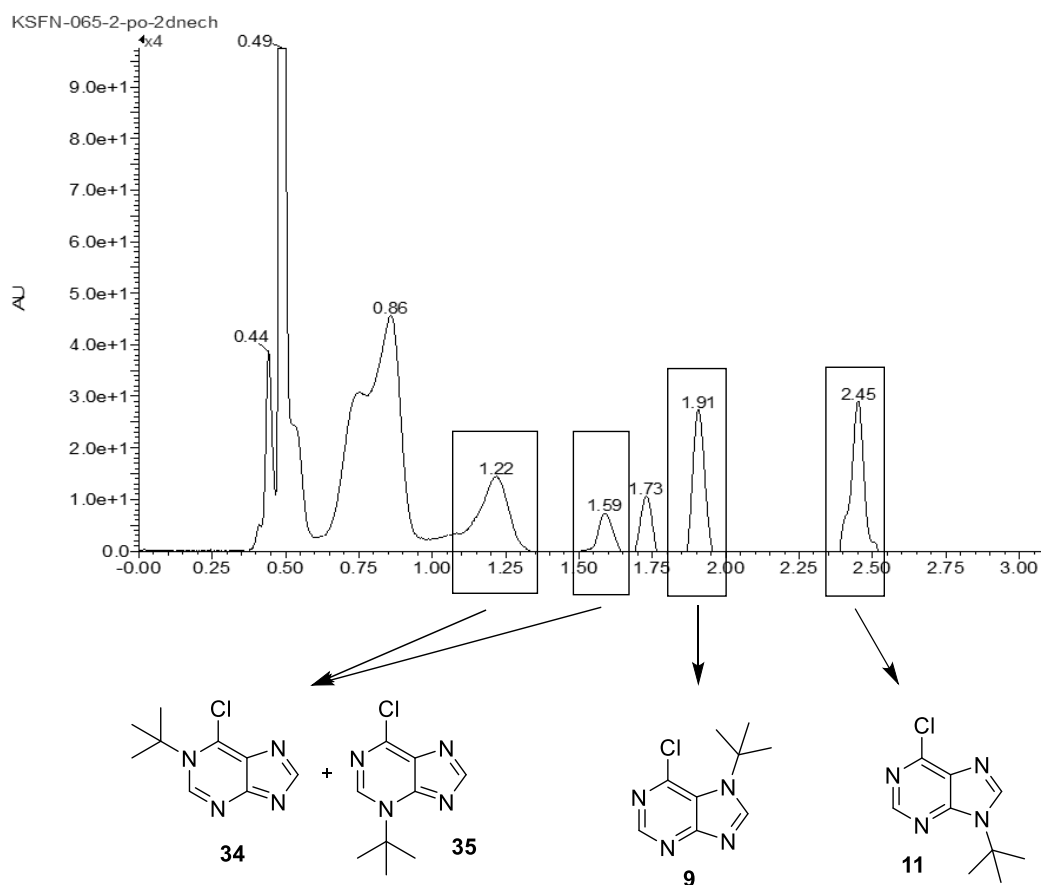
Na základě optimalizačních reakcí, které naznačovaly, že *tert*-butylová skupina nemusí být pevně na atomu dusíku navázána, byly i v dalších kapitolách provedeny reakce, které svým typem modelují různé reakční podmínky, které by mohly stabilitu *tert*-butylu ovlivnit. Zároveň byly voleny i takové reakce, které by umožňovaly využít 7-(*tert*-butyl)-6-chlorpurin a substitucí atomu chloru v poloze C⁶ připravit sloučeniny, které by mohly jako purinové deriváty být zajímavé z pohledu testování biologické aktivity, která je v této práci plánovaná. Snaha je vytvořit u nových purinových sloučenin v poloze C⁶ vazby C-O, C-S, C-C, C-N.

3.3.1 Testování stability sloučeniny **9**

a) v přítomnosti SnCl₄ a rozpouštědla DCE a ACN

Během optimalizace silylační metody vedoucí k přípravě sloučeniny **9** bylo pozorováno na LCMS chromatogramu, že v případě reakce v DCE při zahřívání na 50 °C po 5 dnech docházelo k odštěpení *tert*-butylu z polohy N⁷ produktu **9** a vzniku samotného 6-CIP (pokus 2/Tabulka 7). V případě reakce v ACN při zahřívání na 50 °C docházelo po 19 hodinách ke vzniku směsi i dalších izomerů, které po 5 dnech vymizely a zůstal převážně jediný, nejpravděpodobněji nejstabilnější N⁹ izomer. (pokus 4/Tabulka 8)

Z toho důvodu byly provedeny při 50 °C další dvě testovací reakce za účelem ověření vlivu samotného SnCl₄ (1 eq.) na připravený 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurin (**9**). Jedna reakce byla provedena v DCE a druhá v ACN. V případě použití rozpouštědla DCE byla látka **9** po 21 hodinách stabilní. Po 2 dnech byla pozorována desetinná přeměna na 6-CIP. V případě použití rozpouštědla ACN byla látka **9** po první hodině stabilní. Po 21 hodinách docházelo k přeměně na 6-CIP s konverzí 35 % a náznakem tvorby N⁹ izomeru. Po 2 dnech došlo k téměř úplnému vymizení látky **9** a dominanci 6-CIP a zároveň vzniku celkem 3 dalších minoritních izomerů odvozených od látky **9**, které nejpravděpodobněji odpovídají N¹, N³ a N⁹ izomerům (viz. obrázek 5), kde píky s retenčním časem 1,2 a 1,6 odpovídají N¹ a N³ izomerům **34**, **35**. Pík s retenčním časem 1,9 odpovídá N⁷ izomeru **9** a pík s retenčním časem 2,45 odpovídá N⁹ izomeru **11**. Z reakcí je vidět že na stabilitu látky **9** v přítomnosti Lewisové kyseliny má velký vliv i rozpouštědlo, což je nutné mít na paměti při možné budoucí derivatizaci této sloučeniny.



Obrázek 5 Směs izomerů po 2 dnech reakce vedeny v ACN při 50 °C

b) v roztoku HCl

V dalším případě byla otestována stabilita 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu v kyselém prostředí kyseliny chlorovodíkové (1:10) při 100 °C (25 mg/ml). Již po 15 minutách došlo ke kvantitativnímu odštěpení *terc*-butylu a vzniku směsi 6-CIP a hypoxantinu. Je tedy patrné, že kyselé prostředí sloučenině **9** nesvědčí. Naopak v alkalickém prostředí, jak bylo později zjištěno u přípravy 7-(*terc*-butyl)hypoxantinu **13** (viz. kapitola 3.4.1), je *terc*-butyl stabilní.

c) ve vodě

Stabilita 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu byla testována i ve vodě, zahříváním při 100 °C (25 mg/ml), kdy bylo zjištěno, že až po 24 hodinách dochází pouze k nepatrné konverzi (do 5%) za vzniku směsi hypoxantinu a 6-CIP.

3.4 Využití 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu k přípravě dalších purinových derivátů obsahujících v poloze N⁷-*terc*-butyl

Pro syntézu derivátů vycházejících z 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurinu byla zvolena taková činidla, aby byly získány strukturně odlišné deriváty. Primárně se jednalo o takové deriváty, které budou mít v poloze C⁶ substituenty vázány přes atomy dusíku, kyslíku, uhlíku a síry.

3.4.1 Příprava C⁶ derivátů purinů vázaných přes atom kyslíku

7-(*Terc*-butyl)hypoxantin (13**)**

Prvním derivátem, který byla snaha připravit byl 7-(*terc*-butyl)hypoxantin (**13**). Z předchozích pozorování bylo jasné, že kyselinu chlorovodíkovou použít nelze, jelikož by došlo k odštěpení *terc*-butylu z výchozí látky **9**. Nejprve byl pokus připravit látku **13** za použití kyseliny mravenčí, která je slabší a používá se k šetrné substituci halogenu za hydroxylovou skupinu u purinových glykosidů. Během reakce došlo sice k tvorbě produktu **13**, ale ve směsi dominoval čistý hypoxantin (**31**). Bylo tedy pozorováno, že dochází k odštěpení *terc*-butylu i v kyselém prostředí HCOOH za zvýšené teploty.

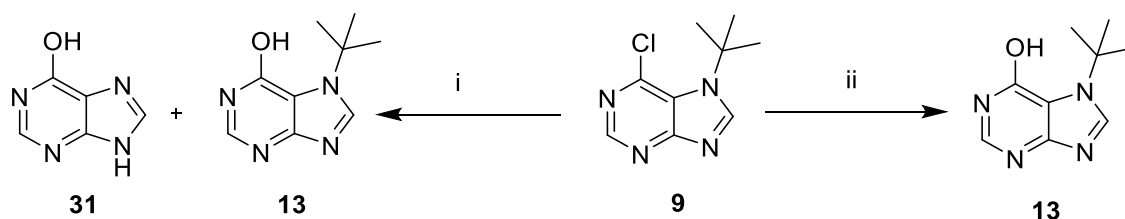


Schéma 33 (i) HCOOH, 75 °C, 1 h (ii) NaOH (3 eq.), H₂O, 100 °C, 30 min., 66 %

Z výše uvedených důvodů byla látka **13** připravena alkalickou hydrolyzou za použití NaOH ve vodě při 100 °C a tím bylo i zjištěno, že *tert*-butyl je za daných podmínek vysokého pH stabilní. Na LCMS chromatogramu byla vidět úplná konverze výchozí látky v produkt za 30 minut. Na závěr byla zneutralizována reakční směs a produkt byl vyloučen z roztoku a odsát.

7-(*Terc*-butyl)-6-ethoxypurin (**14**)

Dalším připraveným derivátem s navázaným substituentem přes atom kyslíku byl 7-(*tert*-butyl)-6-ethoxypurin (**14**). Byl připraven ve vysokém výtěžku v ethanolu za použití ethoxidu sodného. Po zneutralizování byl produkt extrahován ve směsi toluenu a solanky (Schéma 34).

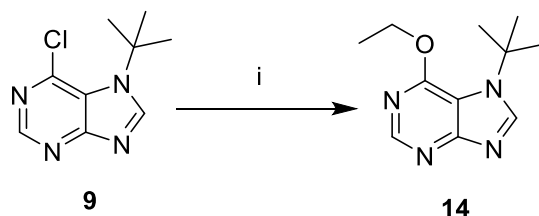


Schéma 34 (i) 1M-EtONa, EtOH, r.t., 30 min., 93 %

3.4.2 Příprava C⁶ derivátů purinů vázaných přes atom síry

7-(*Terc*-butyl)-6-merkaptopurin (**15**)

Jelikož se samotný 6-merkaptopurin používá jako lék proti rakovině, tak bylo zajímavé z hlediska biologické aktivity připravit jeho *tert*-butyl analog **15**.

Nejprve byla snaha látku **15** připravit pomocí thiomocoviny, která je pro podobné systémy popsána v literatuře. Jelikož vznikla směs látek po reakci, tak byla zvolena vhodnější metoda za použití NaSH v DMF. Po provedení reakce byla látka **15** poprvé separována na koloně, čímž došlo během manipulace k oxidaci a vzniku směsi s disulfidem **32**. Proto byla ihned po druhé reakci provedena extrakce za inertních

podmínek ve směsi ethyl-acetátu a solanky, která zahrnovala zejména použití rozpouštědel probubláných dusíkem a proces rychlého převedení v pevný produkt. Ve schéma 35 je znázorněna thioxo tautomerní forma, která byla potvrzena z $^1\text{H-NMR}$ spektra přítomností dubletu na C^2 uhlíku.

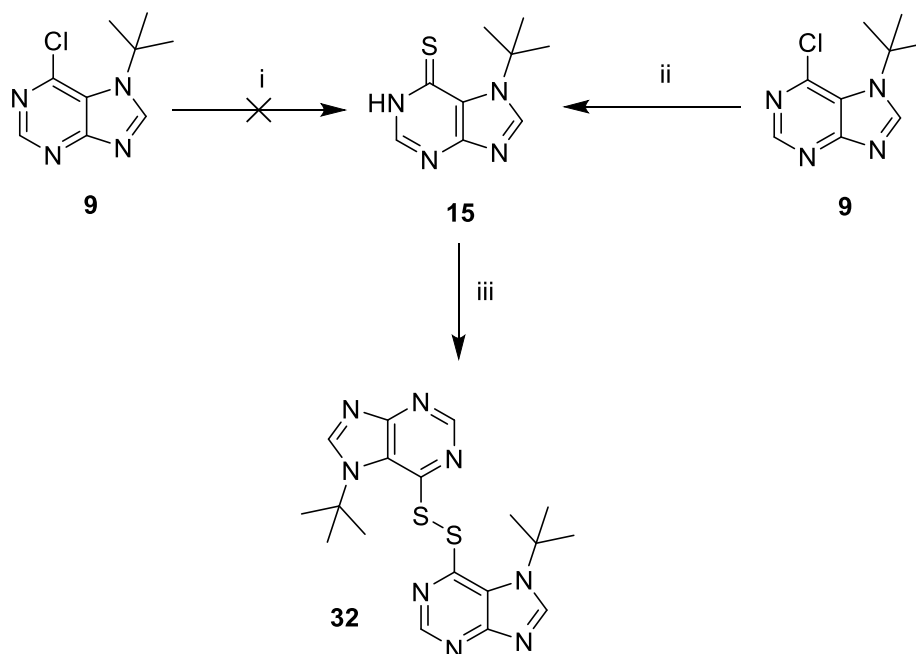


Schéma 35 (i) thioimočovina, ethanol, reflux, 1 h (ii) 4M-NaSH; DMF; r.t.; 1,5 h; 70 %; (iii) vzdušný kyslík

3.4.3 Příprava C^6 derivátů purinů vázaných přes atom dusíku

Z těchto sloučenin je nejzajímavějším zástupcem adenin. Jelikož se adenin vyskytuje ve všech živých buňkách, tak bylo zajímavé z pohledu biologické aktivity připravit i jeho 7-(*tert*-butyl) derivát. Dále byly připraveny i další zajímavé strukturně odlišné deriváty se substituenty v C^6 poloze vázanými přes atom dusíku jako je například analogie známého BAP či *meta*-topolinu, které jsou pak uvedeny ve schéma 39.

6-Azido-7-(*tert*-butyl)purin (16)

6-Azido-7-(*tert*-butyl)purin (16) byl připraven substituční reakcí výchozí látky 9 s azidem sodným v DMSO. Tato sloučenina byla připravena hlavně pro následnou redukci a přípravu adeninu (17).

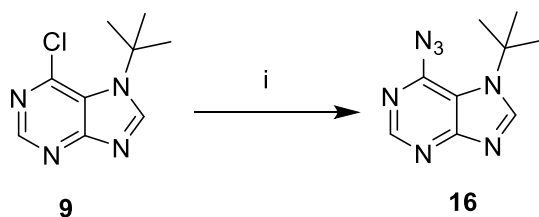


Schéma 36 (i) NaN_3 (3 eq.), DMSO, 60 °C, 3 h, 91 %

7-(*Terc*-butyl)adenin (17)

Bylo by možné tuto látku **17** z prekursoru **9** připravit S_N reakcí s NH_3 , ale bylo by nutné použít drsnější reakční podmínky jako je zahřívání se zkapalněným amoniakem v tlakové ampuli. Z toho důvodu byla zvolena redukce připraveného 6-azido-7-(*terc*-butyl)purinu (**16**).

Nejprve byla otestována Staudingerova reakce, která sice probíhala bez problémů, ale pro jednoduchost zpracování reakční směsi byla zvolena redukce vodíkem za použití katalyzátoru palladia na aktivním uhlí a za tlaku 5 barů.

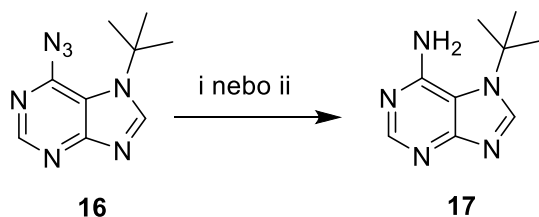


Schéma 37 (i) trifenylfosfin (2 eq.), $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, 2/6/1, 60 °C, 24 h, potom 80 °C, 6 h, konverze: 98 % (LCMS) (ii) 10 %-Pd/C, H_2 , ethanol, 5 bar, 24 h, 75 %

3.4.3.1 Příprava C^6 alkylamino derivátů S_N reakcí

K přípravě níže uvedených N-substituovaných adeninů **18-23** (Schéma 39) byly vybrány zástupci aminů, reprezentující různý typ jejich struktury. Jako první byl připravován benzyalmino derivát **18**, u kterého byly zjišťovány reakční podmínky jeho přípravy využitelné pro další deriváty.

6-Benzylamino-7-(*terc*-butyl)purin (18) a studium optimalizace jeho přípravy

6-Benzylamino-7-(*terc*-butyl)purin (**18**) byl nejprve připravován reakcí výchozí látky (**9**) s benzylaminem (1,2 eq.) v propanolu za použití báze *N,N*-diisopropylethylamin (2 eq.) (Schéma 38). Snahou bylo použít co nejmenší množství benzylaminu, aby výsledná reakční směs nemusela být zpracovávaná chromatograficky, ale co

nejjednodušeji např. nalitím do vody a filtrací vysráženého produktu. Očekávalo se, že původně zvolená reakční teplota 97 °C bude dostatečná pro hladký průběh, jak je u analogických purinových derivátů obecně popisováno v literatuře. Nicméně s konverzí spokojenost ani po 11 hod zahřívání nebyla a bylo nutno podmínky optimalizovat. Reakce byla v průběhu monitorována, jak je uvedeno v tabulce 10.

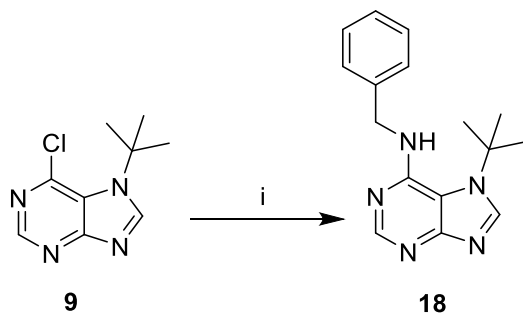


Schéma 38 (i) benzylamin (1,2 eq.), DIPEA (2 eq.), propanol, teplota a čas viz. tabulka 10

Tabulka 10 Optimalizace reakčních podmínek vedoucí k benzylamino derivátu 18

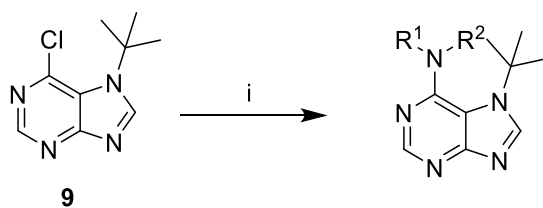
konverze* po 5 h, 97 °C	konverze* po 11 h, 97 °C	konverze* po 18 h, z toho 7 h při 120 °C	konverze* po 22 h, z toho 11 h při 120 °C**
1,6/1	1/1,7	1/3,5	1/11,4

* výchozí látka **9**/produkt **18**, hodnoty z LCMS analýzy; ** přidání 0,8 eq. benzylaminu

Jak je vidět v tabulce 10, tak při kratší reakční době a nižší teplotě nedochází k dostatečné konverzi. K téměř úplné konverzi došlo až po přidání dalšího množství benzylaminu (0,8 eq.) a zvýšením teploty v uzavřené vialce na 120 °C.

S ohledem na dlouhou reakční dobu, která ale už způsobovala tvorbu vedlejších produktů, a ne zcela úplnou konverzi výchozí látky **9** byla další příprava látky **18** provedena zrovna z 1,5 eq. benzylaminu a jako rozpouštědlo byl zvolen výše vroucí butanol. Po 6,5 hodinách při 120 °C byl získán produkt **18** s konverzí výchozí látky 78 %, který po nutné chromatografické separaci výchozí látky **9** a nadbytečného benzylaminu, poskytl výtěžek 64 %.

Na základě optimalizace pro benzylamino derivát **18** byly zvoleny takové reakční podmínky pro následující alkylaminopuriny **19-22** tak, aby docházelo k co nejlepším výtěžkům (Schéma 39).



- 18:** R¹ = H, R² = benzyl
19: R¹ = H, R² = cyklohexyl
20: R¹ = H, R² = 3-hydroxybenzyl
21: R¹ = H, R² = furfuryl
22: R¹ + R² = (CH₂)₅
23: R¹ = H, R² = 4-methoxyfenyl

Schéma 39 Obecné schéma pro přípravu alkylamino derivátů. (i) alkylamin (viz. tabulka 11), DIPEA (2 eq.), butanol, teplota a čas viz. tabulka 11

Tabulka 11 Reakční podmínky pro přípravu alkylamino derivátů 19-22.

alkylaminopurin	Alkylamin / množství		teplota	čas	výtěžek
19	cyklohexylamin	2 eq.	120 °C	13 h	76 %
20	3-hydroxybenzylamin	2 eq.	120 °C	3 h	47 %
21	furfurylamin	2 eq.	120 °C	3 h	75 %
22	piperidin	5 eq.	120 °C	3 h	87 %

S ohledem na reakční dobu a konverzi bylo pro přípravu alkylamino derivátů použito 2 eq. aminu. V případě snadno odstranitelného piperidinu bylo použito rovnou 5 eq. Připravené deriváty, které jsou uvedeny ve schéma 39 byly připraveny analogicky jako benzylamino derivát (**18**). Reakční doba byla zkrácena na 3 hodiny při 120 °C, kromě cyklohexyl derivátu **19** (13 h).

6-(4-Methoxyanilino)-7-(*tert*-butyl)purin (**23**)

6-(4-Methoxyanilino)-7-(*tert*-butyl)purin (**23**) se nepovedlo připravit jako ostatní deriváty S_N reakcí. Výsledkem reakce bylo, že v reakční směsi se nacházela pouze výchozí látka **9** a nezreagovaný 4-methoxyanilin. Z toho důvodu byla otestována Buchwaldova-Hartwigova aminace (používaná k tvorbě vazeb uhlík-dusík reakcí arylhalogenidů s aminy) a použití katalyzátoru XPhos Pd G2 ve směsi dioxan/voda, 4/1 při 100 °C v mikrovlákném reaktoru. Výsledkem reakce byla po 1 hodině pozorována žádná konverze výchozí látky.

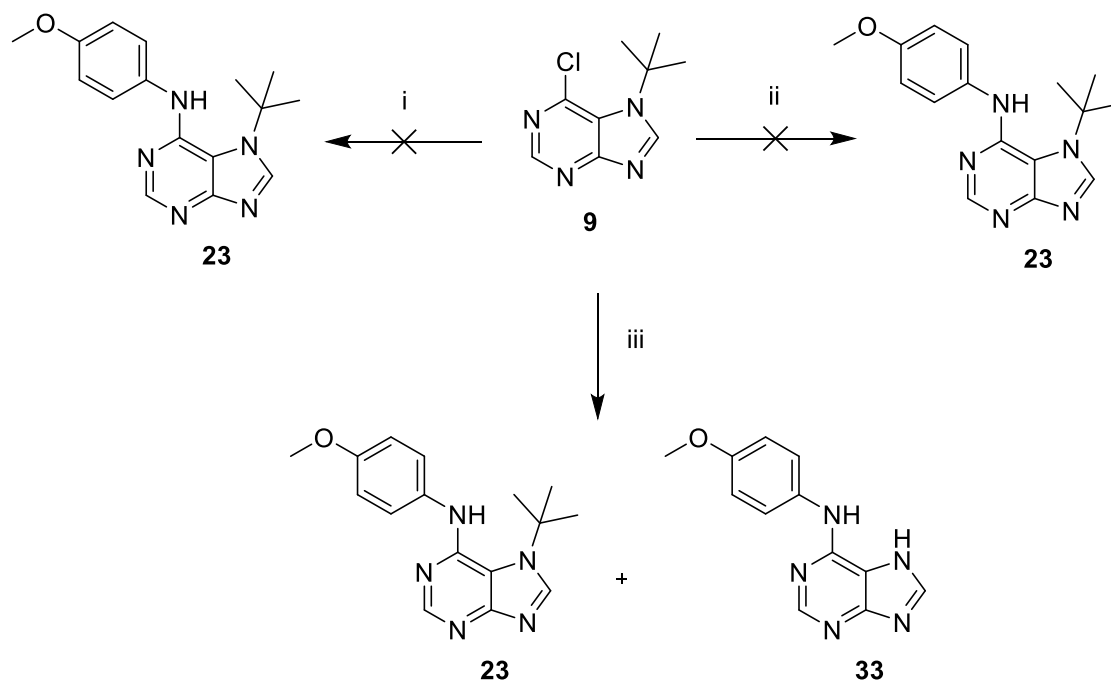


Schéma 40 (i) 4-methoxyanilin (2 eq.), DIPEA (2 eq.), butanol, 120 °C, 3 h
 (ii) V.L. (9) (0,5 mmol), 4-methoxyanilin (1 eq.), K₂CO₃ (4 eq.), XPhos Pd G2 (0,02 eq.), dioxan/voda, 4 ml/1 ml, MW 100 °C, 1 h (iii) 4-methoxyanilin (1 eq.), InCl₃ (0,1 eq.), ACN, MW 120 °C, 30 minut

Nakonec byla látka **23**, ale bohužel ve směsi s produktem **33**, u kterého chyběl *tert*-butyl, připravena podle jiného postupu uvedeného v literatuře⁸⁶ cross-couplingovou reakcí. Reakční podmínky byly aplikovány pro výchozí komponenty za použití popisovaného chloridu inditého, jak je uvedeno ve schéma 40.

Na LCMS chromatogramu byly po reakci v mikrovlnném reaktoru vidět dva hlavní píky, kdy byl v MS spektru u jednoho patrný molekulární iont o hodnotě odpovídající produktu **23** a u druhého byla hodnota odpovídající de-*tert*-butylovanému produktu **33**. Jelikož je chlorid inditý do určité míry kyselý, tak docházelo i k odštěpení *tert*-butylu za vyšší teploty, což opět potvrdilo nestabilitu *tert*-butylu v poloze N⁷ v kyselém prostředí, respektive v prostředí Lewisových kyselin. Z časových důvodů produkt již nebyl izolován a ani dále reakce optimalizována. Zajímavá by zde byla změna rozpouštědla z polárního acetonitrilu, ve kterém je vliv Lewisových kyselin za vyšší teploty výraznější než v případě nepolárních rozpouštědel, jak bylo i dokázáno experimentem v kapitole (3.3.1) o stabilitě sloučeniny **9**.

3.4.4 Příprava C⁶ derivátů purinů vázaných přes atom uhlíku

Pomocí Suzuki cross-couplingových reakcí za použití katalyzátoru Pd(PPh₃)₄ byly připraveny 2 reprezentativní deriváty **24** a **25** mající substituent v poloze C⁶ purinového cyklu vázaný přes atom uhlíku vazbou C-C, kdy byla snaha prostřednictvím boronových kyselin připojit aromatické zbytky. Obě reakce byly provedeny analogicky při 140 °C v mikrovlnném reaktoru, jak je uvedeno ve schéma 41.

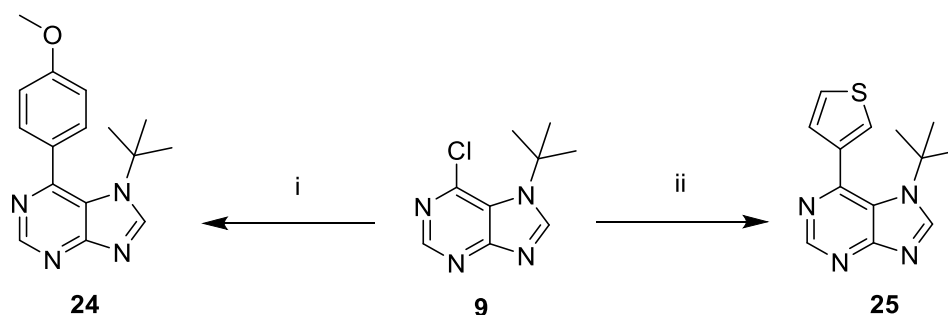


Schéma 41 (i) 4-methoxyfenylboronová kyselina (1,5 eq.); Pd(PPh₃)₄ (0,05 eq.); K₂CO₃ (1,3 eq.); toluen; 140 °C, 30 min.; 66 % (ii) 3-thienylboronová kyselina (1,5 eq.); Pd(PPh₃)₄ (0,05 eq.); K₂CO₃ (1,3 eq.); toluen; MW 140 °C, 30 min.; 84 %

Těmito dvěma cross-couplingovými reakcemi se dokázalo, že za daných podmínek *tert*-butyl zůstává stabilní v poloze N⁷ a je tedy možné touto cestou bez problémů připravovat i jiné C⁶ deriváty s vazbou C-C.

3.5 Cytotoxická a bakteriostatická aktivita připravených sloučenin

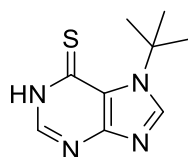
Biologická aktivita purinových derivátů mající substituent v poloze N⁷ není důkladně prozkoumaná, a to právě z důvodu problematického selektivního zavedení substituentu do polohy N⁷. Nicméně v literatuře jsou popsány biologické účinky některých z nich. Z toho důvodu byla testována biologická aktivita připravených sloučenin.

Nejprve byla testována bakteriostatická aktivita připravených sloučenin, kdy se nejprve měří velikost inhibičních zón u jednotlivých bakteriálních kmenů. Pokud je hodnota zóny u dané bakterie větší než 20 mm, pak se postupuje do dalšího kola a zjišťuje se MIC (minimální inhibiční koncentrace) testované látky, při které ještě daná látka bakterii zahubí.

Tabulka 12 bakteriostatická aktivita

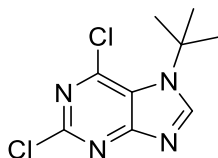
	B. Subtilis	M. Lutteus	M. Vaccae	S. Aureus	P.aeruginosa	E. Coli
látka	Zone/MIC	Zone/MIC	Zone/MIC	Zone/MIC	Zone/MIC	Zone/MIC
9	15	12	10	21	18	27/200
13	15	10	10	20	17	20
14	15	15	11	20	18	28/200
15	16	14	12	18	19	30/25
17	16	16	10	22	19	25/200
18	14	10	13	20	20	25/200
20	15	11	10	19	21	30/200
22	15	13	13	19	13	15
21	15	13	12	20	15	15
19	16	12	11	21	16	13
26	15	14	14	24/200	19	19
24	15	12	13	23/200	17	19
25	14	11	10	18	14	17

Z naměřených hodnot v tabulce 12 je vidět, že z látek, které mají zónu větší než 20 mm má pouze látka **15** významnější minimální inhibiční koncentraci na bakterii E. Coli. Bakteriostatická aktivita ostatních připravených látek je malá.



15

Nově připravené sloučeniny byly testovány i na kinázách CDK2/E, CDK4 a kináze FLT3-ITD, kde ani při základní koncentraci 100 μM látky nevykazovaly inhibici těchto enzymů. Dále byly sloučeniny testovány na cytotoxicitu na dvou leukemických liniích CEM (lymfoidní leukémie) a MV4-11 (myeloidní leukémie). Hodnoty IC_{50} většiny látek jsou kolem 100 μM , což není zajímavé. Ze všech testovaných látek byla nejúčinnější látka **26** jejíž hodnota IC_{50} pro CEM byla 19 μM a pro MV4-11 35 μM .

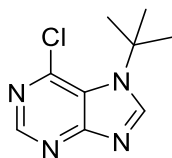


26

4 Experimentální část

Všechny připravované látky byly syntetizovány z komerčně dostupných sloučenin bez čištění v kvalitě deklarované výrobcem. 6-chlorpurin byl před reakcí sušený při 120 ° C po dobu 1 h. Silikagel pro kolonovou chromatografii byl pro jeho aktivaci sušený při 140 ° C po dobu 24 hod. Při reakcích vyžadujících nepřítomnost vody byly použity komerčně dostupné bezvodá rozpouštědla s deklarovaným maximálním obsahem vody s případným dosušením pomocí molekulových sít. Průběh chemických reakcí a čistota připravených sloučenin byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie na hliníkových foliích DC-Kiesegel 60 F₂₅₄ (Merck), detekce byla provedena pomocí UV záření ($\lambda = 254$ nm) a UV inaktivní látky byly vizualizovány ethanolickým roztokem kyseliny fosfomolybdenové. LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému (Waters) složeného z UHPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupólem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μ m, 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 μ l/min. Mobilní fáze byla (A) 0,1% octan amonný ve vodě a (B) 0,1% octan amonný v acetonitrilu. HRMS analýza byla provedena na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej. ¹H a ¹³C NMR spektra byly měřeny v DMSO-*d*₆, resp. CDCl₃-*d* při 25 °C na NMR spektrometru JEOL ECA 400II při frekvenci 400 MHz (¹H) a 100 MHz (¹³C). Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v jednotkách ppm s kalibrací na signál reziduálního rozpouštědla, který je ve spektrech explicitně vyznačen. Teplota tání byla stanovena na Boetiově bloku, hodnoty nejsou korigovány.

7-(*Terc*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**)



Metoda A:

6-Chlor-9*H*-purin (**1**) (775 mg; 5 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém 1,2-dichlorethanu (38 ml) za inertních podmínek. Potom byl přidán *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (1,84 ml; 7,5 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C v termobloku (případně olejové lázni) po dobu 30 minut. Poté byla reakční směs ochlazena ledovou lázní na 0 °C a byl přidán SnCl₄ (1,23 ml; 10,5 mmol). Poté byla reakční směs míchána 30 minut při laboratorní teplotě a byl přidán *tert*-butylbromid (1,68 ml; 15 mmol). Vzniklý roztok byl míchán 19 hodin za laboratorní teploty.

Zpracování: Do reakční směsi byl přidán isopropanol (10 ml) a následně chloroform (50 ml) a voda (30 ml). Byla provedena extrakce. Organická fáze se protřepala dvakrát s NaHCO₃ (2 x 65 ml), na závěr se promyla vodou (30 ml) a solankou (65 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána světle žlutá krystalická látka (792 mg, 75 %)

Metoda B:

Metoda B probíhala analogicky s metodou A s malými obměnami. V metodě B bylo použito bezvodé rozpouštědlo acetonitril (38 ml) a reakční doba pro alkylation byla zkrácena na 3 hodiny. Zpracování proběhlo analogicky, jako v případě metody A s tím rozdílem, že před přidáním chloroformu se většina acetonitrilu nechala odpařit na RVO. Byla získána světle žlutá krystalická látka (825 mg, 78 %).

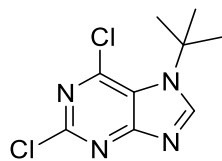
Teplota tání: 194 – 195 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₂ClN₄, 211.0745; naměřené 211.0746

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.85 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 1.91 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.90, 151.84, 146.93, 142.76, 123.22, 59.07, 31.17

7-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (**26**)



7-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (**26**) byl připraven analogicky s postupem přípravy látky **9** metodou A. Reakce byla provedena ještě před optimalizací. 2,6-Dichlor-9*H*-purin (189 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém 1,2-dichlorethanu (10 ml) za inertních podmínek. Potom byl přidán *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 μ l; 1,5 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C v termobloku po dobu 30 minut. Poté byla reakční směs ochlazena ledovou lázní na 0 °C a byl přidán SnCl₄ (246 μ l; 2,1 mmol). Poté byla reakční směs míchána 30 minut při laboratorní teplotě a byl přidán *tert*-butylbromid (168 μ l; 1,5 mmol). Vzniklý roztok byl míchán 19 hodin za laboratorní teploty. Zpracování bylo provedeno analogicky s látkou **9**. Byla získána bílá krystalická látka (31 mg, 13 %)

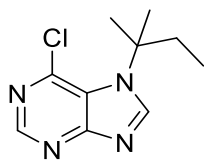
Teplota tání: 193 – 196 °C

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.46 (s, 1H), 1.91 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 165.61, 152.91, 148.25, 143.61, 122.68, 59.54, 30.97

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₁Cl₂N₄, 245.0355; naměřené 245.0355

6-Chlor-7-(*tert*-pentyl)-7*H*-purin (**27**)



6-Chlor-7-(*tert*-pentyl)-7*H*-purin (**27**) byl připraven analogicky s postupem přípravy látky **9** metodou A. 6-Chlor-9*H*-purin (**1**) (155 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém 1,2-dichlorethanu (10 ml) za inertních podmínek. Potom byl přidán *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 μ l; 1,5 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C v termobloku po dobu 30 minut. Poté byla reakční směs ochlazena ledovou lázní na 0

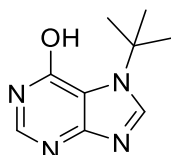
°C a byl přidán SnCl₄ (246 µl; 2,1 mmol). Poté byla reakční směs míchána 30 minut při laboratorní teplotě a byl přidán 2-bromo-2-methylbutan (328 µl; 3 mmol). Vzniklý roztok byl míchán 17 hodin za laboratorní teploty. Zpracování bylo provedeno analogicky s látkou **9**. Byla získána bílá krystalická látka (78 mg, 35 %)

Teplota tání: 86 – 89 °C

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.84 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 2.30 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.85 (s, 6H), 0.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.92, 151.74, 147.64, 142.86, 123.17, 62.28, 34.49, 28.72, 8.38

7-(*Terc*-butyl)-7*H*-purin-6-ol (**13**)



Do 5 ml vialky byl navážen 7-(*terc*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (100 mg; 0,48 mmol) a byla přidána voda (4 ml). Nakonec byl přidán NaOH (60 mg, 1,44 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku na 100 °C po dobu 30 minut. Pomocí zředěné kyseliny octové bylo zneutralizováno pH na 7 až 8, reakční směs byla zchlazena přes noc v lednici a vyloučený produkt byl zfiltrován. Byla získána bílá krystalická látka (60 mg, 66 %)

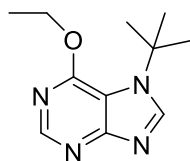
Teplota tání: 268 – 269 °C

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₃N₄O₁, 193.1084; naměřené 193.1085

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 12.40 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 1.81 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 159.88, 155.27, 144.49, 141.19, 115.61, 58.60, 29.95

7-(*Terc*-butyl)-6-ethoxy-7*H*-purin (**14**)



Do 5 ml vialky byl navážen 7-(*tert*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (100 mg; 0,48 mmol) a byl rozpuštěn ve 2 ml ethanolu. Potom byl přidán ethoxid sodný (1,5 ml; 1 mmol/ml). Reakční směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zneutralizována zředěnou kyselinou octovou, zředěna toluenem (5 ml) a extrahována solankou (2 x 2,5 ml). Organická fáze byla sušena pomocí MgSO₄ a odpařena na RVO. Byla získána bílá krystalická látka (98 mg, 93 %).

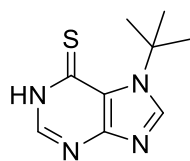
Teplota tání: 85 – 87 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₁H₁₇N₄O₁, 221.1397; naměřené 221.1398

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.60 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 4.66 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.76 (s, 9H), 1.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.34, 155.56, 151.85, 143.22, 112.64, 63.15, 57.97, 30.17, 14.41

7-(*Terc*-butyl)-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-thion (**15**)



Do 10 ml vialky byl navážen 7-(*tert*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (150 mg; 0,71 mmol) a byl rozpuštěn v DMF (4,3 ml). Byl přidán hydrogensulfid sodný (893 μl, 4M NaSH) a reakční směs byla míchána 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs zneutralizována zředěnou kyselinou octovou, zředěna ethylacetátem (80 ml) a protřepána solankou (3 x 30 ml). Extrakce byla provedena za inertních podmínek, která zahrnovala zejména použití rozpouštědel probublávaných dusíkem a proces rychlého převedení v pevný produkt. Organická fáze byla sušena pomocí MgSO₄ a odpařena na RVO. Byla získána bílá krystalická látka (104 mg, 70 %)

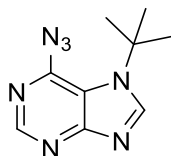
Teplota tání: 250 – 252 °C

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_9H_{13}N_4S_1$, 209.0855; naměřené 209.0854

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.60 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.92 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 169.92, 156.14, 146.10, 144.83, 127.33, 59.50, 30.79

6-Azido-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin (**16**)



Do 10 ml vialky byl navážen 7-(*tert*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (300 mg; 1,43 mmol) a byl rozpuštěn v DMSO (5,7 ml). Byl přidán azid sodný (279 mg, 4,3 mmol) a reakční směs byla míchána 4 hodiny při 60 °C. Poté byla reakční směs zředěna ethylacetátem (100 ml) a extrahována solankou (3 x 40 ml). Organická fáze byla sušena pomocí $MgSO_4$ a odpařena na RVO. Byla získána bílá krystalická látka (282 mg, 91 %)

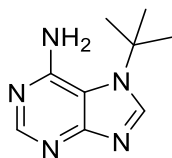
Teplota tání: 220 – 222 °C

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_9H_{12}N_7$, 218.1149; naměřené 218.1149

1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM- d) δ 9.57 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 1.97 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM- d) δ 152.81, 143.23, 142.02, 133.64, 110.69, 59.45, 29.19

7-(*Terc*-butyl)-7*H*-purin-6-amin (**17**)



Do 25 ml baňky byl navážen 6-azido-7-(*terc*-butyl)-7*H*-purin (**16**) (100 mg, 0,46 mmol), 10 %-palladium na aktivním uhlí (25 mg) a byl přidán ethanol (12 ml). Redukce byla provedena během 24 hodin za tlaku 5 bar v autoklávu. Reakční směs byla přefiltrována přes mikrofiltr a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Poté byla provedena rekrystalizace z vody (1,5 ml). Byla získána bílá krystalická látka (66 mg, 75 %).

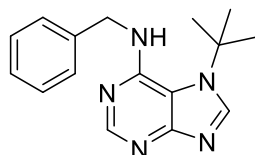
Teplota tání: 287 – 290 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₄N₅, 192.1244; naměřené 192.1243

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.35 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 6.66 (s, 2H), 1.69 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.50, 151.78, 150.65, 143.46, 110.75, 56.24, 30.94

N-Benzyl-7-(*terc*-butyl)-7*H*-purin-6-amin (**18**)



Do 5 ml vialky byl navážen 7-(*terc*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (105 mg; 0,5 mmol) a byl rozpuštěn ve 2 ml butanolu. Byl přidán benzylamin (81,3 μl; 0,75 mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (173,5 μl; 1 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku na 120 °C po dobu 6,5 hodiny. Po odpaření byl produkt separován na chromatografické koloně o průměru 4 cm (směs methanolu v dichlormethanu 1,5/40). Byla získána světle oranžová krystalická látka (90 mg, 64 %).

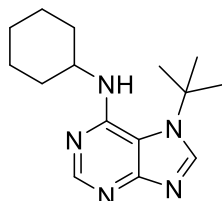
Teplota tání: 176 – 178 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₆H₂₀N₅, 282.1713; naměřené 282.1711

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.57 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.29-7.40 (m, 5H), 5.34 (s, 1H), 4.88 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.75 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 161.56, 152.79, 149.54, 142.12, 138.30, 128.90, 127.70, 127.68, 111.81, 56.11, 45.93, 31.73

7-(*Terc*-butyl)-*N*-cyklohexyl-7*H*-purin-6-amin (**19**)



Do 5 ml vialky byl navážen 7-(*terc*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (110 mg; 0,52 mmol) a byl rozpuštěn ve 2 ml butanolu. Byl přidán cyklohexylamin (120 μl ; 1,04 mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (182 μl ; 1,04 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku na 120 °C po dobu 13 hodin a poté byl přidán ještě cyklohexylamin (60 μl , 0,52 mmol) a směs zahřívána další 2 hodiny. Po odpaření byl produkt separován na koloně o průměru 4 cm (směs methanolu v dichlormethanu 1,5/40). Byla získána světle hnědá krystalická látka (108 mg, 76 %).

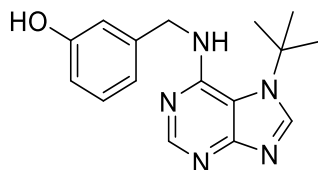
Teplota tání: 144 – 146 °C

HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočítané pro $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_5$, 274.2026; naměřené 274.2028

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.45 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.99 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.20-4.29 (m, 1H), 2.07-2.11 (m, 2H), 1.75 (s, 9H), 1.58-1.72 (m, 3H), 1.41-1.51 (m, 2H), 1.19-1.32 (m, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 161.24, 152.72, 149.08, 141.68, 111.61, 55.90, 49.46, 33.03, 31.65, 25.53, 24.48

3-(((7-(*Terc*-butyl)-7*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (**20**)



Do 5 ml vialky byl navážen 7-(*tert*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (110 mg; 0,52 mmol) a byl rozpuštěn ve 2 ml butanolu. Byl přidán 3-hydroxybenzylamin (128 mg, 1,04 mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (182 μ l; 1,04 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku na 120 °C po dobu 3 hodin. Po odpaření byl produkt separován na koloně o průměru 4 cm (směs methanolu v dichlormethanu 1,5/40). Byla získána světle žlutá krystalická látka (73 mg, 47 %).

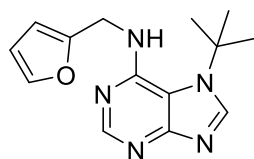
Teplota tání: 109 – 112 °C

HRMS (ESI, *m/z*): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_{16}H_{20}N_5O_1$, 298.1662; naměřené 298.1662

1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.79 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.10 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.89 (dd, $J = 8.1, 2.3$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.48 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.81 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.71 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 160.40, 158.03, 152.33, 149.83, 141.98, 139.47, 129.92, 118.54, 115.34, 114.83, 111.68, 56.50, 45.68, 31.66

7-(*Terc*-butyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (**21**)



7-(*Terc*-butyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (**21**) byl připraven analogicky s postupem přípravy látky **20** s použitím alkylačního činidla furfurylaminu (100 μ l, 1,04 mmol). Zpracování bylo provedeno analogicky s mobilní směsí pro separaci na koloně (methanol v dichlorethanu 2/40). Byla získána hnědá krystalická látka (106 mg, 75 %).

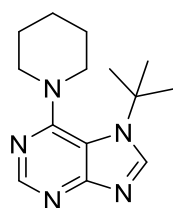
Teplota tání: 164 – 166 °C

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_{14}H_{18}N_5O_1$, 272.1506; naměřené 272.1505

1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.56 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 6.33-6.34 (m, 1H), 6.30 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.86 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.77 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 161.57, 152.62, 151.31, 149.16, 142.25, 142.20, 111.96, 110.55, 107.49, 56.16, 38.71, 31.63

7-(*Terc*-butyl)-6-(piperidin-1-yl)-7*H*-purin (**22**)



7-(*Terc*-butyl)-6-(piperidin-1-yl)-7*H*-purin (**22**) byl připraven analogicky s postupem přípravy látky **20** s použitím alkylačního činidla piperidinu (256 μ l, 2,6 mmol). Reakční směs byla zředěna toluenem (5 ml) a extrahována solankou (2 x 8 ml). Poté byla organická fáze odpařena na RVO. Byla získána světle oranžová krystalická látka (118 mg, 87 %).

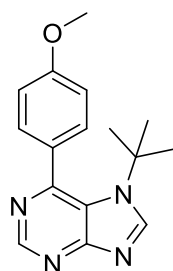
Teplota tání: 167 – 169 °C

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_{14}H_{22}N_5$, 260.1870; naměřené 260.1873

1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.89 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 3.04 (t, $J = 5.3$ Hz, 4H), 1.83 (s, 9H), 1.71-1.76 (m, 4H), 1.65-1.67 (m, 2H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 164.84, 158.71, 152.73, 146.27, 119.56, 58.98, 53.12, 30.04, 25.64, 23.79

7-(*Terc*-butyl)-6-(4-methoxyfenyl)-7*H*-purin (**24**)



Do tlakové zkumavky byly naváženy následující komponenty: 7-(*tert*-butyl)-6-chlor-7*H*-purin (**9**) (100 mg; 0,48 mmol); 4-methoxyfenylboronová kyselina (83 mg, 0,72 mmol); uhličitan draselný (83 mg, 0,6 mmol); Pd(PPh₃)₄ (26,7 mg, 0,023 mmol) a nakonec byl přidán toluen (6 ml). Zkumavka byla vložena do mikrovlnného reaktoru a míchána 30 minut při 140 °C. Po odpaření byl produkt separován na koloně o průměru 4 cm (směs methanolu v dichlormethanu 1,5/40). Byla získána bílá krystalická látka (88 mg, 66 %).

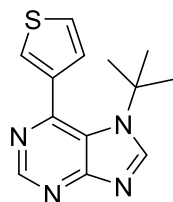
Teplota tání: 142 – 146 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₆H₁₉N₄O₁, 283.1553; naměřené 283.1551

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.05 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 1.47 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 162.85, 160.32, 153.18, 151.67, 147.54, 132.62, 130.29, 124.09, 113.77, 58.72, 55.39, 30.80

7-(*Terc*-butyl)-6-(thiofen-3-yl)-7*H*-purin (**25**)



7-(*Terc*-butyl)-6-(thiofen-3-yl)-7*H*-purin (**25**) byl připraven analogicky s postupem přípravy látky **24** s použitím 3-thienylboronové kyseliny (92 mg, 0,72 mmol). Zpracování proběhlo analogicky. Byla získána oranžová krystalická látka (103 mg, 84 %).

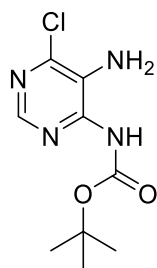
Teplota tání: 164 – 167 °C

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_{13}H_{15}N_4S_1$, 259.1012; naměřené 259.1012

1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.05 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.1, 3.2$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 1.50 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 162.88, 151.71, 148.95, 147.48, 140.11, 128.65, 126.48, 125.87, 124.52, 58.63, 30.55

Terc-butyl-(5-amino-6-chlorpyrimidin-4-yl)karbamát (**6**)



Terc-butyl-6-chlor-7,8-dihydro-9*H*-purin-9-karboxylát (**4**) (0,47 g; 1,84 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém DMF (7,3 ml) a THF (2,4 ml), poté byl přidán bis(trimethylsilyl)amid lithný (1,92 ml; 1,93 mmol) při - 78 °C. Směs byla míchána minutu při - 78 °C a poté byl přidán *terc*-butylbromid (620 μ l; 5,5 mmol). Následně byla reakční směs zahřáta na laboratorní teplotu a míchána 20 minut. Po odpaření byl produkt separován na koloně o průměru 4 cm (směs methanolu v dichlormethanu 0,5/40). Byla získána krystalická látka (56 mg, 12 %).

HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ vypočítané pro $C_9H_{14}Cl_1N_4O_2$, 245.0800; naměřené 245.0800

1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.44 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 5.46 (s, 2H), 1.46 (s, 9H)

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.35, 144.75, 144.41, 142.65, 130.14, 80.19, 27.87

5 Závěr

Jelikož v literatuře pro chlorované puriny nebyly doposud popsány efektivní metody, které umožňují zavedení terciárního zbytku do polohy N⁷, tak byl prostor k tomu, pokusit se takovou metodu vyvinout. Zcela novou metodu se vyvinout podařilo, kdy její novost spočívá ve využití silylačních podmínek ve spojení s *terc*-halogenderivátem, umožňující regioselektivní zavedení do polohy N⁷ chlorpurinových derivátů.

Aplikovali jsme silylační metodu katalyzovanou chloridem cíničitým v dichlorethanu na zavedení *terc*-butylu do polohy N⁷ 6-chlorpurinu za použití *t*-BuBr. Po precizní optimalizaci jsme se dostali do takového bodu, kdy jsme získali ve vysoké čistotě surový produkt s vysokým stupněm konverze a vysokým výtěžkem. Zároveň se nám povedlo eliminovat přítomnost jiných izomerů, které při určitých podmínkách touto metodou vznikají. Vyvinutá metoda umožnila i snadno odstranit zbytkové množství výchozí látky a byla s úspěchem použita pro přípravu 7-(*terc*-butyl)-2,6-dichlorpurinu a 7-(*terc*-pentyl)-6-chlorpurinu.

Nově připravený, doposud v literatuře nepopsaný 7-(*terc*-butyl)-6-chlorpurin byl dále substituován v poloze C⁶ a byla připravena řada nových purinových derivátů mající v poloze C⁶ vazby C-O, C-S, C-C, C-N. Celkem bylo v průběhu bakalářské práce připraveno a charakterizováno 17 nových sloučenin.

Připravené sloučeniny byly testovány na cytotoxickou a bakteriostatickou aktivitu. Sloučeniny bohužel nejsou významně biologicky aktivní. Zajímavou bakteriostatickou aktivitu (MIC: 25 μM) jevila látka **15**. Zajímavá cytotoxická aktivita (IC₅₀: 19 μM) pro linii CEM byla nalezena u sloučeniny **26**. Sloučenina **26** jako jediná má atom chloru jak v poloze C⁶, tak v poloze C². Z toho důvodu by mohlo být v budoucnu zajímavé připravit deriváty 7-(*terc*-butyl)purinu mající substituenty v poloze C⁶ i C², které by mohly vykazovat biologickou aktivitu.

6 Literatura

- (1) Calderón-Arancibia, J.; Espinosa-Bustos, C.; Cañete-Molina, Á.; Tapia, R.; Faúndez, M.; Torres, M.; Aguirre, A.; Paulino, M.; Salas, C. Synthesis and Pharmacophore Modelling of 2,6,9-Trisubstituted Purine Derivatives and Their Potential Role as Apoptosis-Inducing Agents in Cancer Cell Lines. *Molecules* **2015**, *20* (4), 6808–6826. <https://doi.org/10.3390/molecules20046808>.
- (2) Rosemeyer, H. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1* (3), 361–401. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490033>.
- (3) Legraverend, M.; Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (12), 3987–4006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.12.060>.
- (4) De Clercq, E. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10* (4), 674–693. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.674>.
- (5) Melroy, J.; Nair, V. The Antiviral Activity, Mechanism of Action, Clinical Significance and Resistance of Abacavir in the Treatment of Pediatric AIDS. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (29), 3847–3852. <https://doi.org/10.2174/138161205774580642>.
- (6) Kay, N. Abnormal T-cell subpopulation function in CLL: excessive suppressor (T gamma) and deficient helper (T mu) activity with respect to B-cell proliferation. *Blood* **1981**, *57* (3), 418–420. <https://doi.org/10.1182/blood.V57.3.418.418>.
- (7) Nabhan, C.; Gartenhaus, R. B.; Tallman, M. S. Purine nucleoside analogues and combination therapies in B-cell chronic lymphocytic leukemia: dawn of a new era. *Leuk. Res.* **2004**, *28* (5), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.08.017>.
- (8) Marr, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *J. Lab. Clin. Med.* **1991**, *118* (2), 111–119.
- (9) Fidias, P.; Chabner, B. A.; Grossbard, M. L. Purine Analogs for the Treatment of Low-Grade Lymphoproliferative Disorders. *Oncologist* **1996**, *1* (3), 125–139.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.1-3-125>.

- (10) Quan, D. J.; Peters, M. G. Antiviral therapy: nucleotide and nucleoside analogs. *Clin. Liver Dis.* **2004**, *8* (2), 371–385. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.02.012>.
- (11) Hansen, S. W.; Skovsgaard, T.; Sørensen, J. B. Treatment of small cell lung cancer with 6-mercaptopurine: a phase II study. *Cancer Treat. Rep.* **1985**, *69* (5), 555.
- (12) Munshi, P. N.; Lubin, M.; Bertino, J. R. 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy. *Oncologist* **2014**, *19* (7), 760–765. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0178>.
- (13) Masson, C. [Treatment of herpes with acyclovir]. *Presse Med.* **1983**, *12* (22), 1399–1400.
- (14) Wang, X.; Wang, L.; Wu, N.; Ma, X.; Xu, J. Clinical Efficacy of Oral Ganciclovir for Prophylaxis and Treatment of Recurrent Herpes Simplex Keratitis. *Chin. Med. J. (Engl.)* **2015**, *128* (1), 46–50. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.147808>.
- (15) Vince, R. Synthesis and anti-HIV activity of carbovir and related carbocyclic nucleosides. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1991**, *Ā. 25*, 193–194.
- (16) Hsieh, W.-S.; Soo, R.; Peh, B.-K.; Loh, T.; Dong, D.; Soh, D.; Wong, L.-S.; Green, S.; Chiao, J.; Cui, C.-Y.; Lai, Y.-F.; Lee, S.-C.; Mow, B.; Soong, R.; Salto-Tellez, M.; Goh, B.-C. Pharmacodynamic Effects of Seliciclib, an Orally Administered Cell Cycle Modulator, in Undifferentiated Nasopharyngeal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (4), 1435–1442. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1748>.
- (17) Whittaker, S. R.; te Poele, R. H.; Chan, F.; Linardopoulos, S.; Walton, M. I.; Garrett, M. D.; Workman, P. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Seliciclib (R-roscovitine; CYC202) Decreases the Expression of Mitotic Control Genes and Prevents Entry into Mitosis. *Cell Cycle* **2007**, *6* (24), 3114–3131. <https://doi.org/10.4161/cc.6.24.5142>.
- (18) MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine)

Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II–Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* **2005**, *65* (12), 5399–5407. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0233>.

- (19) McClue, S. J.; Blake, D.; Clarke, R.; Cowan, A.; Cummings, L.; Fischer, P. M.; MacKenzie, M.; Melville, J.; Stewart, K.; Wang, S.; Zhelev, N.; Zheleva, D.; Lane, D. P. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int. J. Cancer* **2002**, *102* (5), 463–468. <https://doi.org/10.1002/ijc.10738>.
- (20) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (2), 771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>.
- (21) Havlíček, L.; Hanuš, J.; Veselý, J.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Shaw, G.; Strnad, M. Cytokinin-Derived Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and *cdc2* Inhibitory Activity of Olomoucine and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (4), 408–412. <https://doi.org/10.1021/jm960666x>.
- (22) Law, M. E.; Corsino, P. E.; Narayan, S.; Law, B. K. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88* (5), 846–852. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099325>.
- (23) Maleki Vareki, S.; Salim, K. Y.; Danter, W. R.; Koropatnick, J. Novel anti-cancer drug COTI-2 synergizes with therapeutic agents and does not induce resistance or exhibit cross-resistance in human cancer cell lines. *PLoS One* **2018**, *13* (1), e0191766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191766>.
- (24) Sielecki, T. M.; Boylan, J. F.; Benfield, P. A.; Trainor, G. L. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Useful Targets in Cell Cycle Regulation. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1021/jm990256j>.
- (25) Gray, N.; Détivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L. ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6* (9), 859–875.
- (26) Veselý, J.; Havlíček, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (2),

771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>.

- (27) Evers, D. L.; Breitenbach, J. M.; Borysko, K. Z.; Townsend, L. B.; Drach, J. C. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 1 by Purines and Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines Does Not Correlate with Antiviral Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (8), 2470–2476. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2470-2476.2002>.
- (28) Ostrov, D. A.; Hernández Prada, J. A.; Corsino, P. E.; Finton, K. A.; Le, N.; Rowe, T. C. Discovery of Novel DNA Gyrase Inhibitors by High-Throughput Virtual Screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (10), 3688–3698. <https://doi.org/10.1128/AAC.00392-07>.
- (29) Khazir, J.; Mir, B. A.; Chashoo, G.; Pilcher, L.; Riley, D. Synthesis and anticancer activity of N-9- and N-7- substituted 1,2,3 triazole analogues of 2,6-di-substituted purine. *Med. Chem. Res.* **2020**, *29* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02456-9>.
- (30) De Clercq, E.; Descamps, J.; Verhelst, G.; Walker, R. T.; Jones, A. S.; Torrence, P. F.; Shugar, D. Comparative Efficacy of Antiherpes Drugs against Different Strains of Herpes Simplex Virus. *J. Infect. Dis.* **1980**, *141* (5), 563–574. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.5.563>.
- (31) de Clercq, E. Virus-drug resistance: thymidine kinase-deficient (TK-) mutants of herpes simplex virus. Therapeutic approaches. *Ann. Ist. Super. Sanita* **1987**, *23* (4), 841–847.
- (32) Neyts, J.; Jahne, G.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Winkler, I.; De Clercq, E. In vivo antiherpesvirus activity of N-7-substituted acyclic nucleoside analog 2-amino-7-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]purine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39* (1), 56–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.56>.
- (33) Hynie, S. *Speciální farmakologie Díl IV. Látky ovlivňující kardiovaskulární systém, 1. vydání*; Karolinum, 2001.
- (34) Otyepka, M.; Kryštof, V.; Havlíček, L.; Siglerová, V.; Strnad, M.; Koča, J. Docking-Based Development of Purine-like Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase-2. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (13), 2506–2513. <https://doi.org/10.1021/jm990506w>.

- (35) Wade Harper, J.; Elledge, S. J. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1996**, *6* (1), 56–64. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(96\)90011-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(96)90011-8).
- (36) Sherr, C. J.; Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **1995**, *9* (10), 1149–1163. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1149>.
- (37) Morgan, D. O. CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13* (1), 261–291. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.261>.
- (38) Harper, J. W.; Adams, P. D. Cyclin-Dependent Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2511–2526. <https://doi.org/10.1021/cr0001030>.
- (39) Sicinski, P.; Donaher, J. L.; Parker, S. B.; Li, T.; Fazeli, A.; Gardner, H.; Haslam, S. Z.; Bronson, R. T.; Elledge, S. J.; Weinberg, R. A. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **1995**, *82* (4), 621–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90034-9).
- (40) Sicinski, P.; Donaher, J. L.; Geng, Y.; Parker, S. B.; Gardner, H.; Park, M. Y.; Robker, R. L.; Richards, J. S.; McGinnis, L. K.; Biggers, J. D.; Eppig, J. J.; Bronson, R. T.; Elledge, S. J.; Weinberg, R. A. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* **1996**, *384* (6608), 470–474. <https://doi.org/10.1038/384470a0>.
- (41) Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science* (80-.). **1996**, *274* (5293), 1672–1677. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>.
- (42) Reed, S. I. Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* **1997**, *29*, 7–23.
- (43) Rebhun, L. I.; White, D.; Sander, G.; Ivy, N. Cleavage inhibition in marine eggs by puromycin and 6-dimethylaminopurine. *Exp. Cell Res.* **1973**, *77* (1–2), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90582-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90582-X).
- (44) Neant, I.; Guerrier, P. 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* **1988**, *176* (1), 68–79. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90121-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90121-8).
- (45) Meijer, L.; Pondaven, P. Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin

- egg mitotic divisions. *Exp. Cell Res.* **1988**, *174* (1), 116–129. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90147-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90147-4).
- (46) Rialet, V.; Meijer, L. A new screening test for antimitotic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res.* *11* (4), 1581–1590.
- (47) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (2), 771–786. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00771.x>.
- (48) Meijer, L.; Raymond, E. Roscovitine and Other Purines as Kinase Inhibitors. From Starfish Oocytes to Clinical Trials. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (6), 417–425. <https://doi.org/10.1021/ar0201198>.
- (49) Węsierska-Gądek, J.; Kryštof, V. Selective Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Discriminating between Cell Cycle and Transcriptional Kinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171* (1), 228–241. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04726.x>.
- (50) Knockaert, M.; Lenormand, P.; Gray, N.; Schultz, P.; Pouyssegur, J.; Meijer, L. p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor purvalanol. *Oncogene* **2002**, *21* (42), 6413–6424. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205908>.
- (51) O'Connor, D. S.; Wall, N. R.; Porter, A. C. ; Altieri, D. C. A p34cdc2 survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2002**, *2* (1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00084-3).
- (52) Edamatsu, H.; Gau, C.-L.; Nemoto, T.; Guo, L.; Tamanoi, F. Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* **2000**, *19* (27), 3059–3068. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203625>.
- (53) Matushansky, I.; Radparvar, F.; Skoultschi, A. I. Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (26), 14317–14322. <https://doi.org/10.1073/pnas.250488697>.

- (54) Sandal, T.; Stapnes, C.; Kleivdal, H.; Hedin, L.; Døskeland, S. O. A Novel, Extraneuronal Role for Cyclin-dependent Protein Kinase 5 (CDK5). *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (23), 20783–20793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112248200>.
- (55) Wan, Z.-K.; Wacharasindhu, S.; Binnun, E.; Mansour, T. An Efficient Direct Amination of Cyclic Amides and Cyclic Ureas. *Org. Lett.* **2006**, *8* (11), 2425–2428. <https://doi.org/10.1021/ol060815y>.
- (56) Lu, W.; Sengupta, S.; Petersen, J. L.; Akhmedov, N. G.; Shi, X.; Bennett, C. E.; Virginia, W.; Uni, V.; Virginia, W.; March, R. V. Mitsunobu Coupling of Nucleobases and Alcohols: An Efficient, Practical Synthesis for Novel Nonsugar Carbon Nucleosides A simple facile synthesis of substituted purine derivatives has been developed by using Mitsunobu conditions for an alcohol and a res. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5012–5015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo070515+>.
- (57) Zatloukal, M.; Jorda, R.; Gucký, T.; Řezníčková, E.; Voller, J.; Pospíšil, T.; Malínková, V.; Adamcová, H.; Kryštof, V.; Strnad, M. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *61*, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.036>.
- (58) Stanovnik, B.; Tisler, M.; Hribar, A.; Barlin, G.; Brown, D. Methylation of heterocyclic compounds containing NH, SH and/or OH groups by means of *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal. *Aust. J. Chem.* **1981**, *34* (8), 1729. <https://doi.org/10.1071/CH9811729>.
- (59) Pulido, D.; Sánchez, A.; Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A. Guanine-Containing DNA Minor-Groove Binders. *European J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (9), 1398–1406. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200800892>.
- (60) Calderón-Arancibia, J.; Espinosa-Bustos, C.; Cañete-Molina, Á.; Tapia, R.; Faúndez, M.; Torres, M.; Aguirre, A.; Paulino, M.; Salas, C. Synthesis and Pharmacophore Modelling of 2,6,9-Trisubstituted Purine Derivatives and Their Potential Role as Apoptosis-Inducing Agents in Cancer Cell Lines. *Molecules* **2015**, *20* (4), 6808–6826. <https://doi.org/10.3390/molecules20046808>.
- (61) Okamura, T.; Kikuchi, T.; Fukushi, K.; Arano, Y.; Irie, T. A novel noninvasive

- method for assessing glutathione-conjugate efflux systems in the brain. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (9), 3127–3133. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.02.045>.
- (62) Paleta Oldřich. *Kinetické metody v organické chemii*; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1986.
- (63) Kotek, V.; Chudíková, N.; Tobrman, T.; Dvořák, D. Selective Synthesis of 7-Substituted Purines via 7,8-Dihydropurines. *Org. Lett.* **2010**, *12* (24), 5724–5727. <https://doi.org/10.1021/ol1025525>.
- (64) Kotek, V.; Tobrman, T.; Dvořák, D. Highly Efficient and Broad-Scope Protocol for the Preparation of 7-Substituted 6-Halopurines via N⁹-Boc-Protected 7,8-Dihydropurines. *Synthesis (Stuttg.)*. **2012**, *2012* (04), 610–618. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1290068>.
- (65) Rodenko, B.; Koch, M.; van der Burg, A. M.; Wanner, M. J.; Koomen, G.-J. The Mechanism of Selective Purine C-Nitration Revealed: NMR Studies Demonstrate Formation and Radical Rearrangement of an N⁷-Nitramine Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (16), 5957–5963. <https://doi.org/10.1021/ja042590x>.
- (66) Chen, S.; Graceffa, R. F.; Boezio, A. A. Direct, Regioselective N -Alkylation of 1,3-Azoles. *Org. Lett.* **2016**, *18* (1), 16–19. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02994>.
- (67) MONTGOMERY, J. A.; HEWSON, K. 7-Substituted 7H-Purines 1. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (11), 4469–4472. <https://doi.org/10.1021/jo01069a066>.
- (68) Kelley, J. L.; Bullock, R. M.; Krochmal, M. P.; McLean, E. W.; Linn, J. A.; Durcan, M. J.; Cooper, B. R. 6-(Alkylamino)-9-alkylpurines. A New Class of Potential Antipsychotic Agents. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (20), 3207–3216. <https://doi.org/10.1021/jm960662s>.
- (69) Prasad, R. N.; Robins, R. K. Potential Purine Antagonists. VIII. The Preparation of Some 7-Methylpurines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (24), 6401–6407. <https://doi.org/10.1021/ja01581a015>.
- (70) Gonnella, N. C.; Nakanishi, H.; Holtwick, J. B.; Horowitz, D. S.; Kanamori, K.; Leonard, N. J.; Roberts, J. D. Studies of tautomers and protonation of adenine and its derivatives by nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J.*

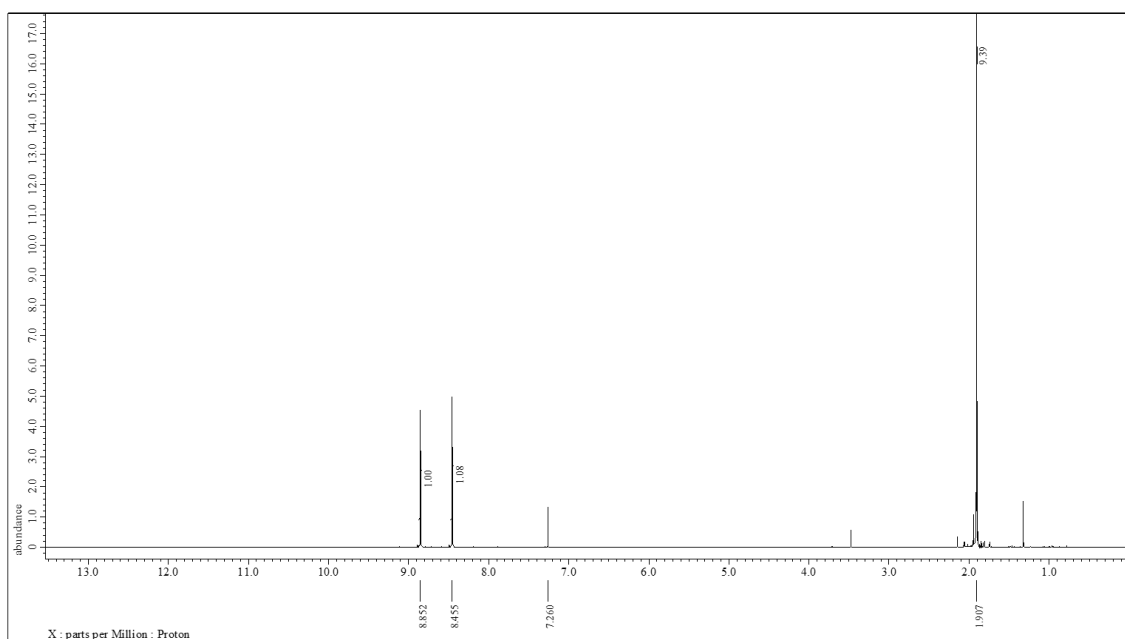
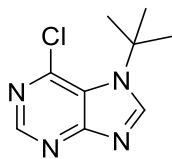
- Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1021/ja00345a063>.
- (71) Birkofer, L.; Ritter, A.; Kühnthau, H. P. Harnsäure-3-ribofuranosid und Harnsäure-3-glucofuranosid N-Glykoside durch siliciumorganische Synthese. *Angew. Chemie* **1963**, *75* (4), 209–210. <https://doi.org/10.1002/ange.19630750415>.
- (72) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis*; John Wiley & Sons, 2001.
- (73) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2006. <https://doi.org/10.1039/9781847555380>.
- (74) Schwarz, S.; Csuk, R.; Rauter, A. P. Microwave-assisted synthesis of novel purine nucleosides as selective cholinesterase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (15), 2446–2456. <https://doi.org/10.1039/C4OB00142G>.
- (75) Robins, M. J.; Zou, R.; Guo, Z.; Wnuk, S. F. Nucleic Acid Related Compounds. 93. A Solution for the Historic Problem of Regioselective Sugar–Base Coupling To Produce 9-Glycosylguanines or 7-Glycosylguanines 1. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (26), 9207–9212. <https://doi.org/10.1021/jo9617023>.
- (76) Jähne, G.; Kroha, H.; Müller, A.; Helsberg, M.; Winkler, I.; Gross, G.; Scholl, T. Regioselective Synthesis and Antiviral Activity of Purine Nucleoside Analogues with Acyclic Substituents at N⁷. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, *33* (5), 562–563. <https://doi.org/10.1002/anie.199405621>.
- (77) Kohda, K.; Baba, K.; Kawazoe, Y. Chemical reactivity of alkylguanines. I. Methylation of O6-methylguanine derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (50), 6285–6288. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91353-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91353-X).
- (78) Singh, D.; Wani, M. J.; Kumar, A. A Simple Solution to the Age Old Problem of Regioselective Functionalization of Guanine: First Practical Synthesis of Acyclic N⁹ - and/or N⁷ -Guanine Nucleosides Starting from N² , N⁹ -Diacetylguanine. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (13), 4665–4668. <https://doi.org/10.1021/jo982304y>.
- (79) Pappo, D.; Kashman, Y. Synthesis of 9-substituted tetrahydrodiazepinopurines—asmarine A analogues. *Tetrahedron* **2003**, *59* (34), 6493–6501.

[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)01058-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)01058-5).

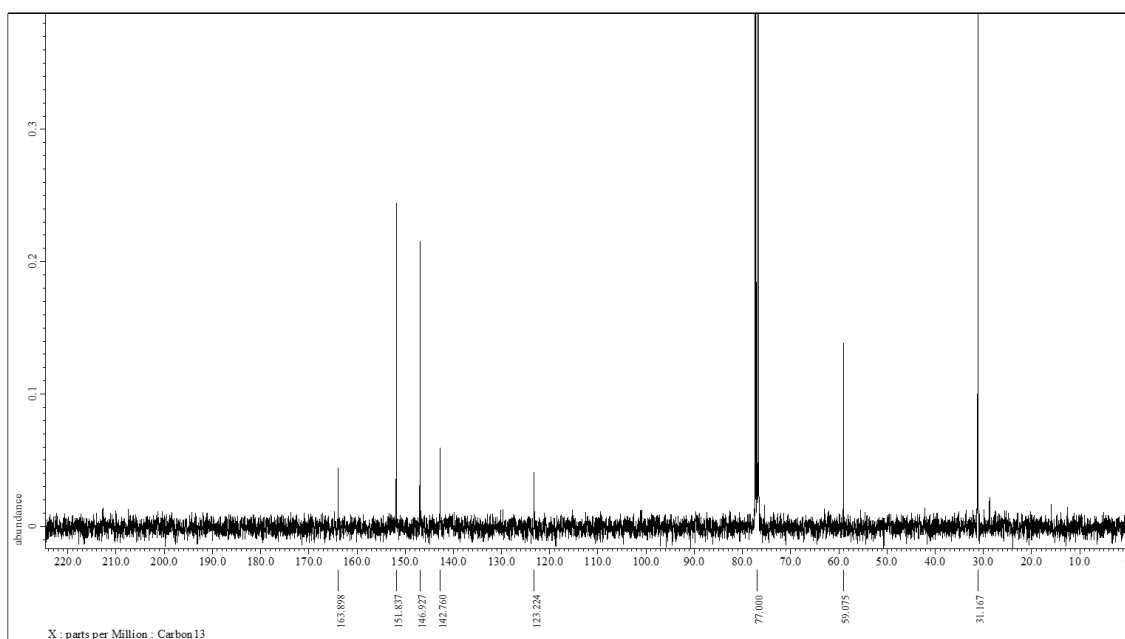
- (80) Hakimelahi, G. H.; Ly, T. W.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Jain, M. L.; Zakerinia, M.; Davari, H.; Mei, H.-C.; Sambaiah, T.; Moshfegh, A. A.; Hakimelahi, S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Nucleoside and Nucleotide Analogues as Agents against DNA Viruses and/or Retroviruses. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (22), 3710–3720. <https://doi.org/10.1021/jm010216r>.
- (81) Lebraud, H.; Cano, C.; Carbain, B.; Hardcastle, I. R.; Harrington, R. W.; Griffin, R. J.; Golding, B. T. Trifluoroethanol solvent facilitates selective N-7 methylation of purines. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (11), 1874. <https://doi.org/10.1039/c3ob27473j>.
- (82) Chen, S.; Graceffa, R. F.; Boezio, A. A. Direct, Regioselective N-Alkylation of 1,3-Azoles. *Org. Lett.* **2016**, *18* (1), 16–19. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02994>.
- (83) Tranová, L. N⁷-regioselektivní glykosylace derivátů purinu, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2019.
- (84) Tumma, H.; Nagaraju, N.; Reddy, K. V. N-Alkylation of 2,6-Dichloropurine Hydrochloride with a Variety of Alcohols over Alumina Catalyst. *Synth. Commun.* **2010**, *40* (12), 1856–1866. <https://doi.org/10.1080/00397910903162791>.
- (85) Dilek Celik, G.; Disli, A.; Oner, Y.; Acik, L. Synthesis of some novel amino and thiotetrazole purine derivatives and investigation of their antimicrobial activity and DNA interactions. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22* (3), 1470–1479. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0140-9>.
- (86) Staderini, M.; Bolognesi, M. L.; Menéndez, J. C. Lewis Acid-Catalyzed Generation of CC and CN Bonds on π -Deficient Heterocyclic Substrates. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (1), 185–195. <https://doi.org/10.1002/adsc.201400674>.

7 Přílohy

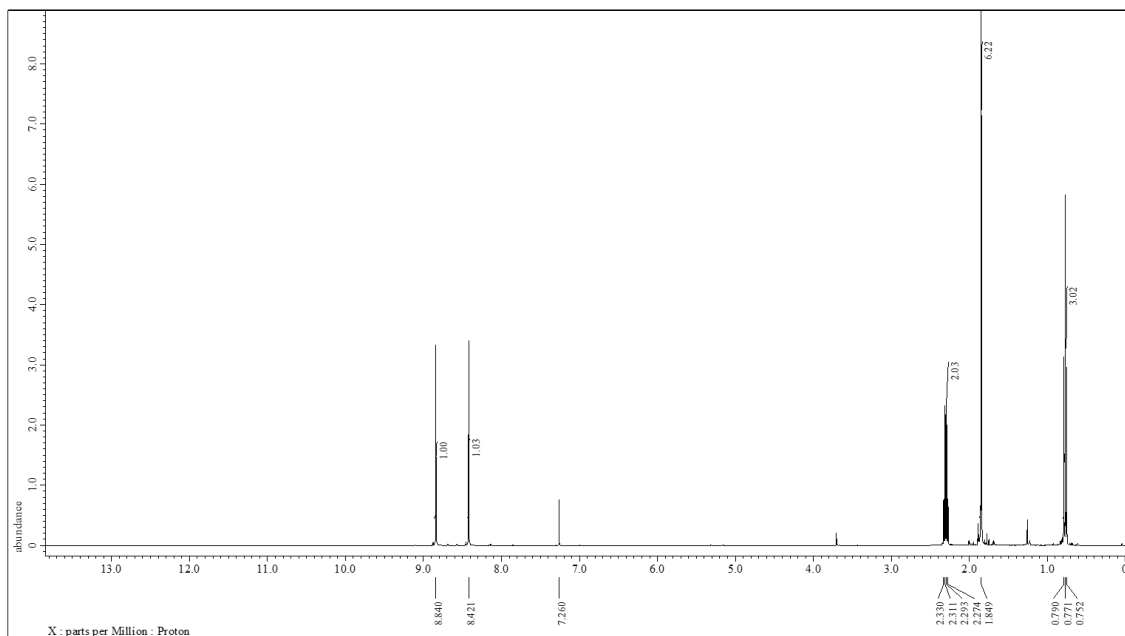
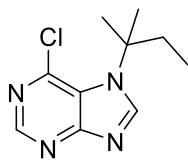
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-6-chloro-7*H*-purin (9)



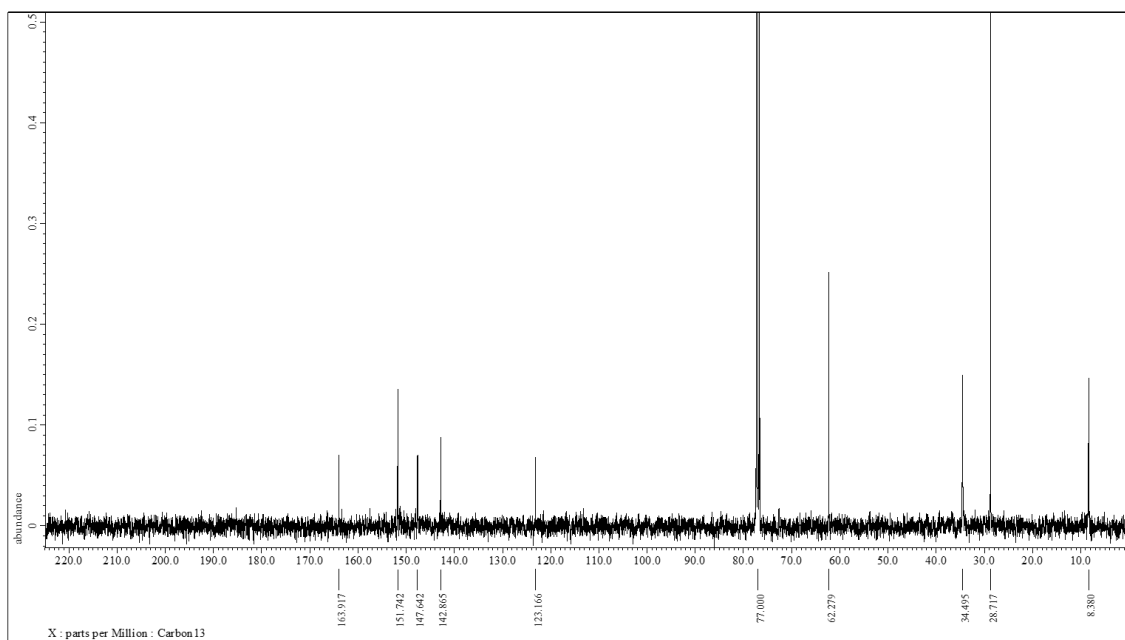
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



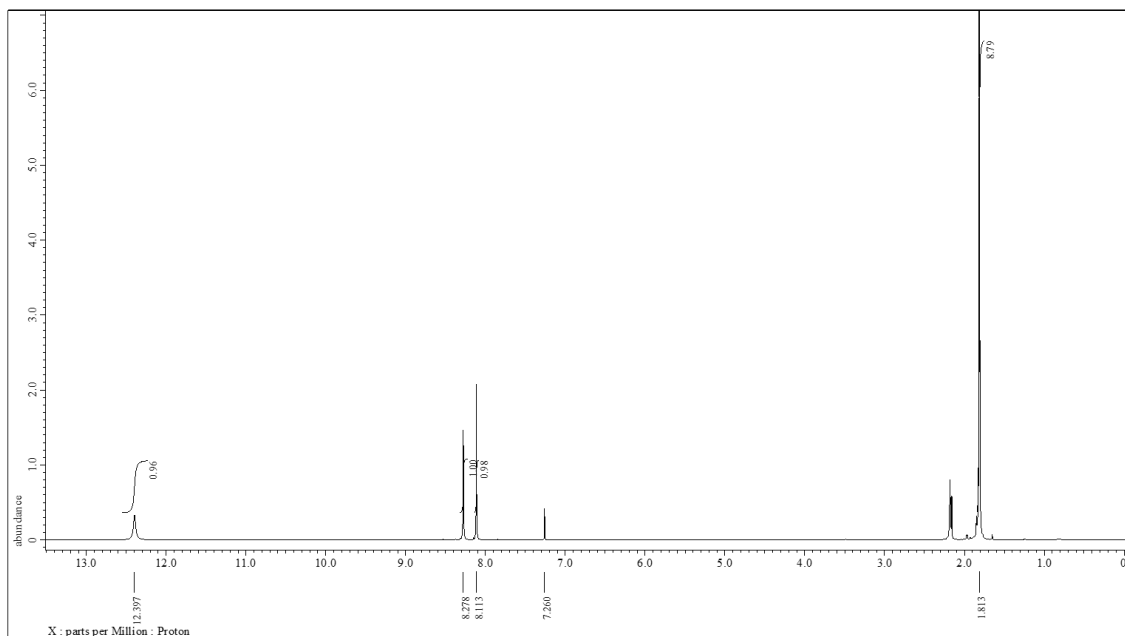
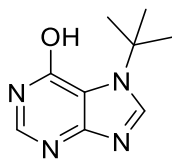
¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 6-chloro-7-(*tert*-pentyl)-7*H*-purin (**27**)



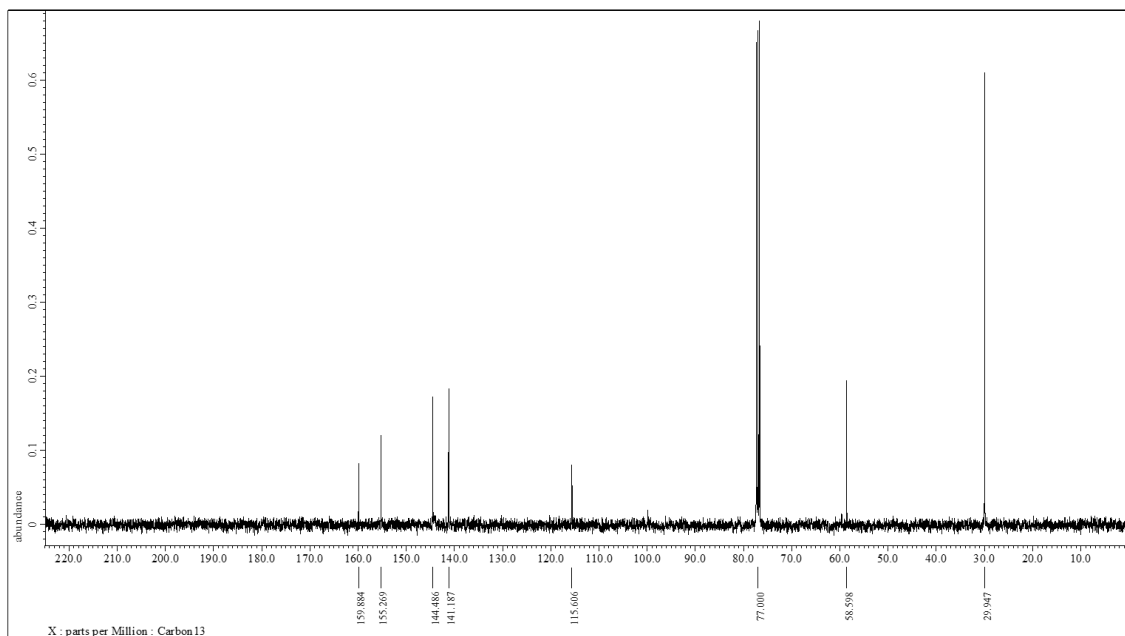
¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



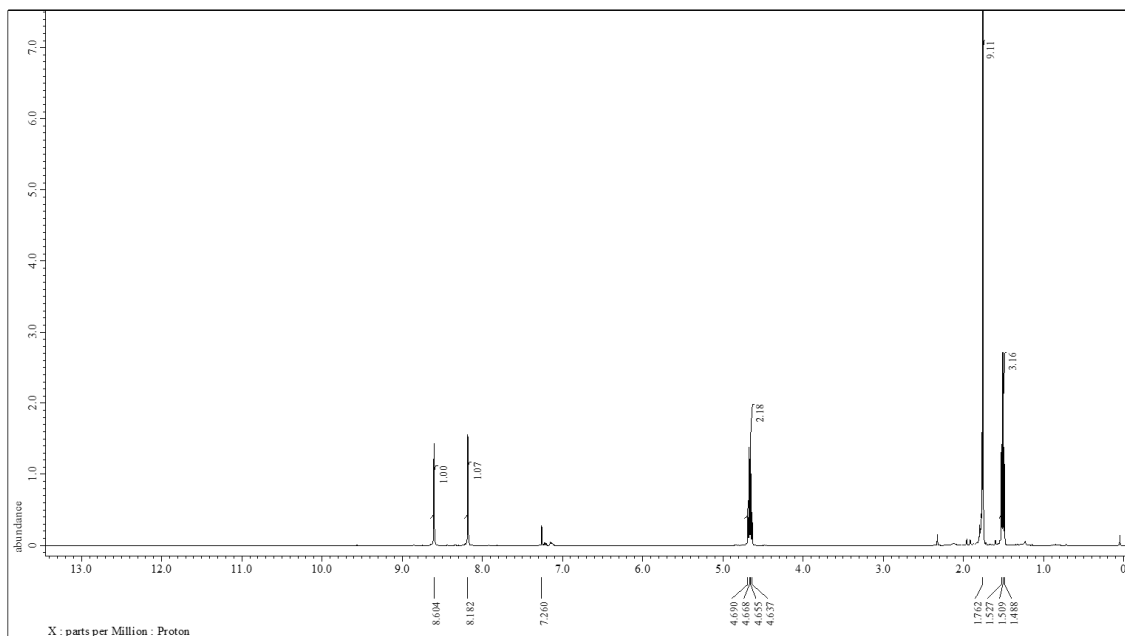
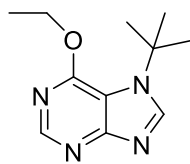
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-6-ol (**13**)



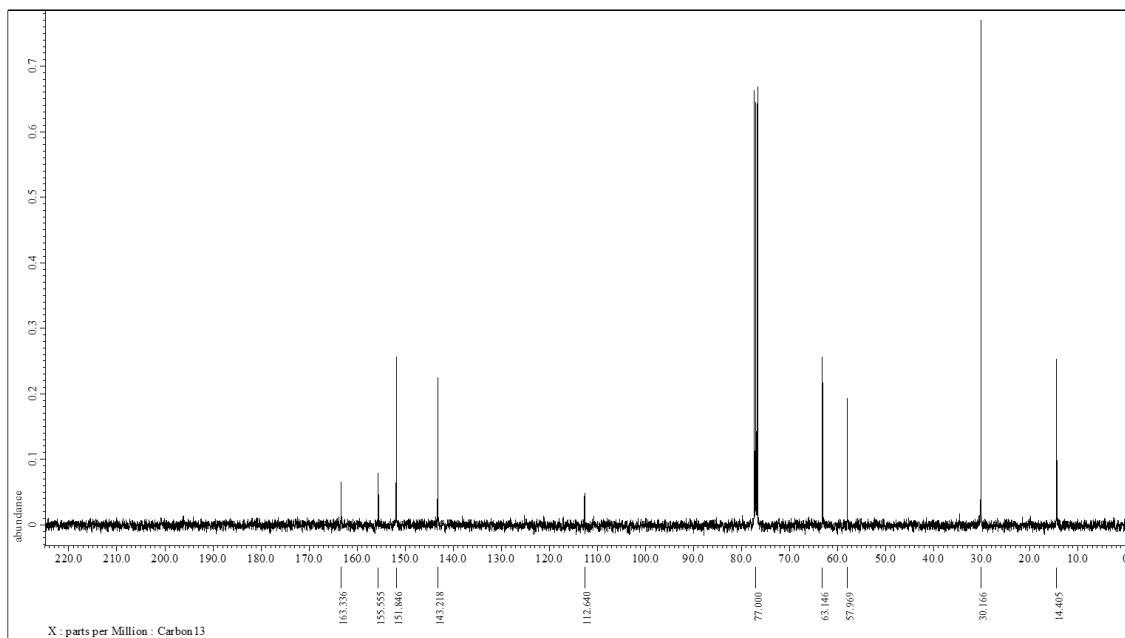
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



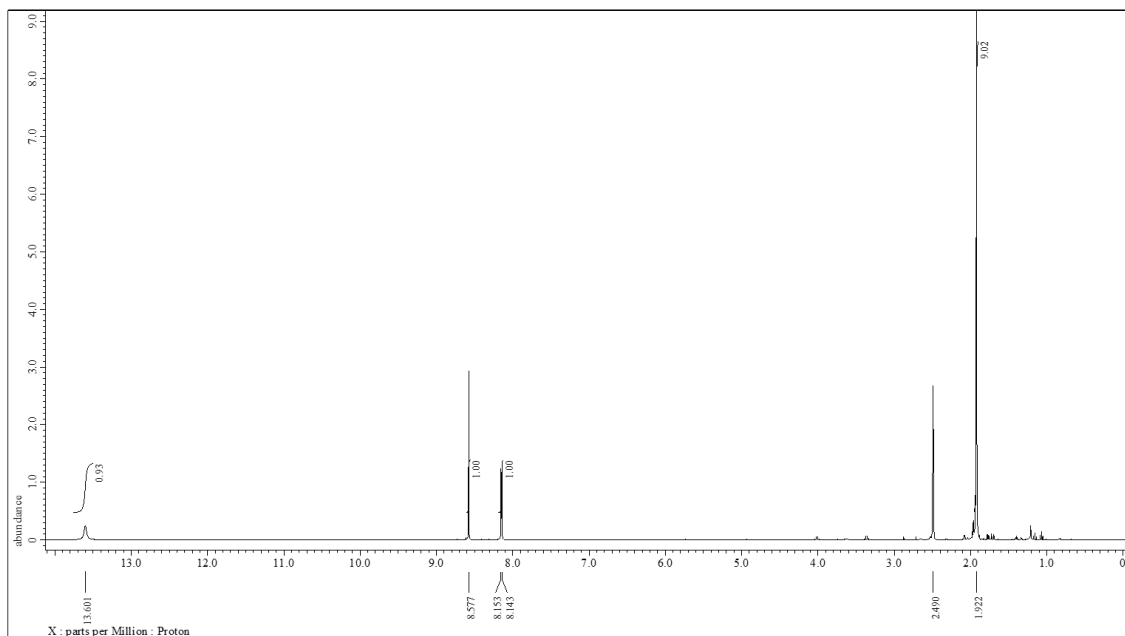
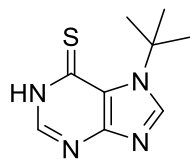
¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-6-ethoxy-7*H*-purin (**14**)



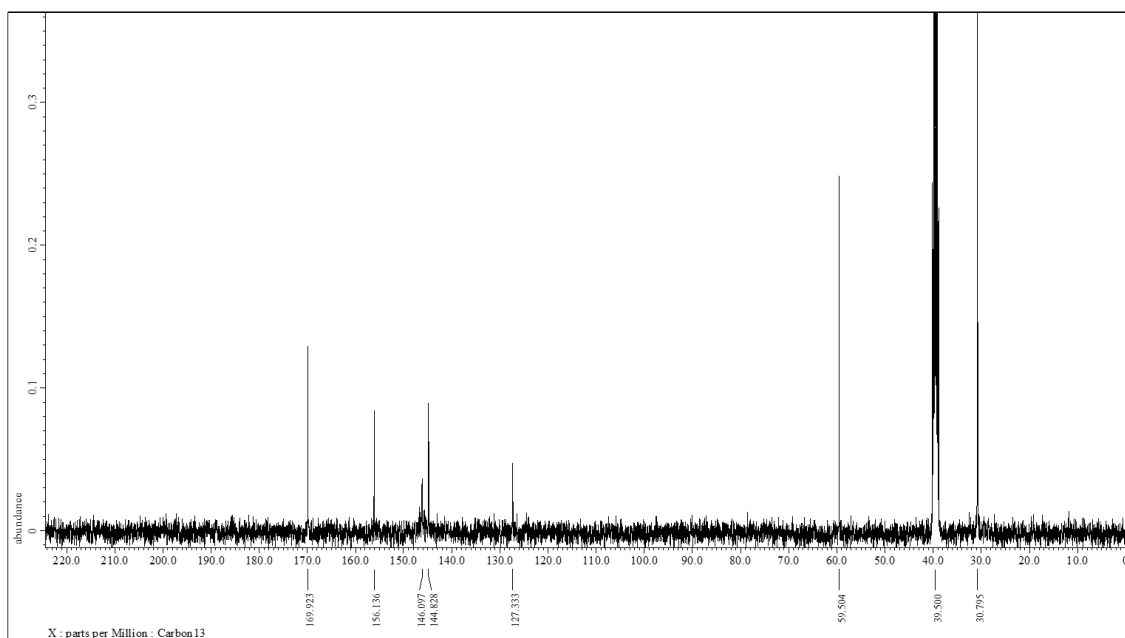
¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



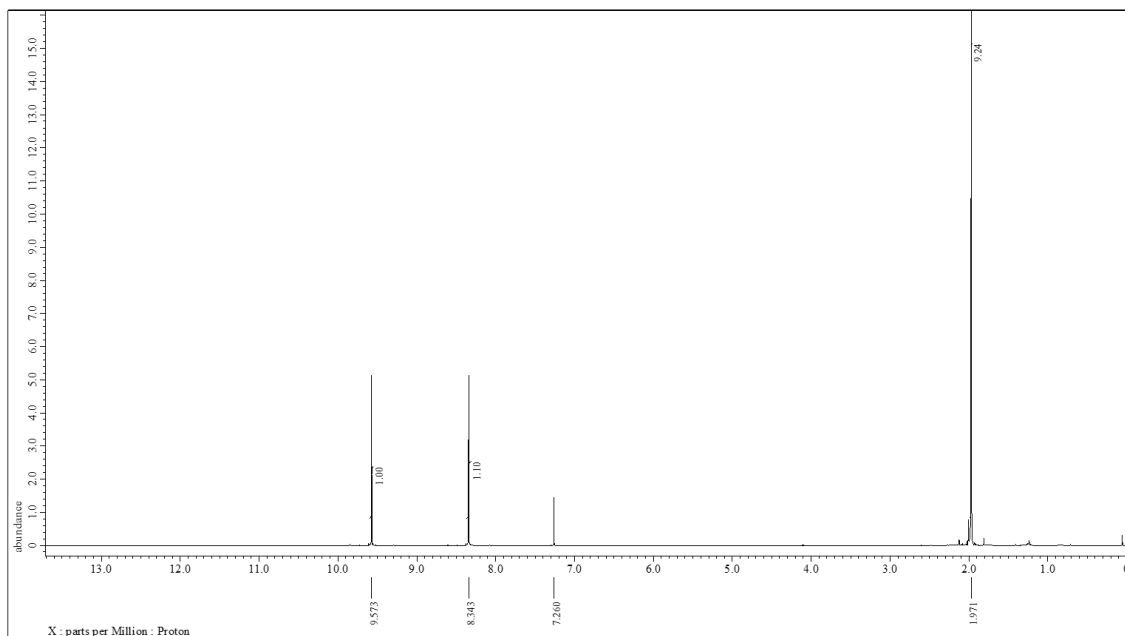
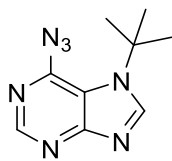
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 7-(*tert*-butyl)-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-thion (**15**)



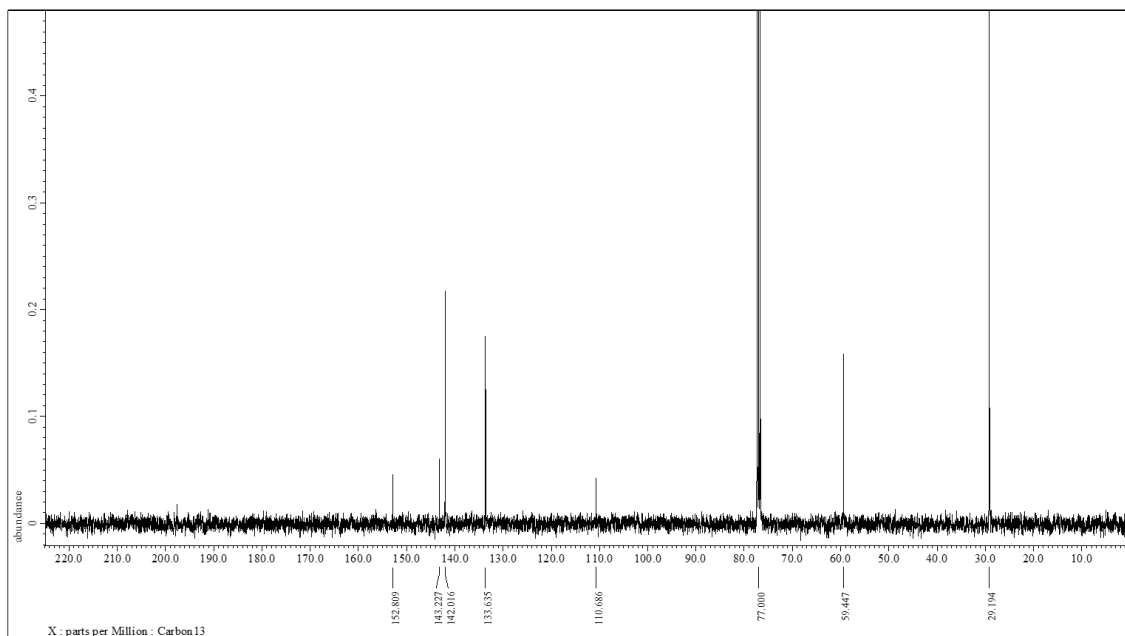
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



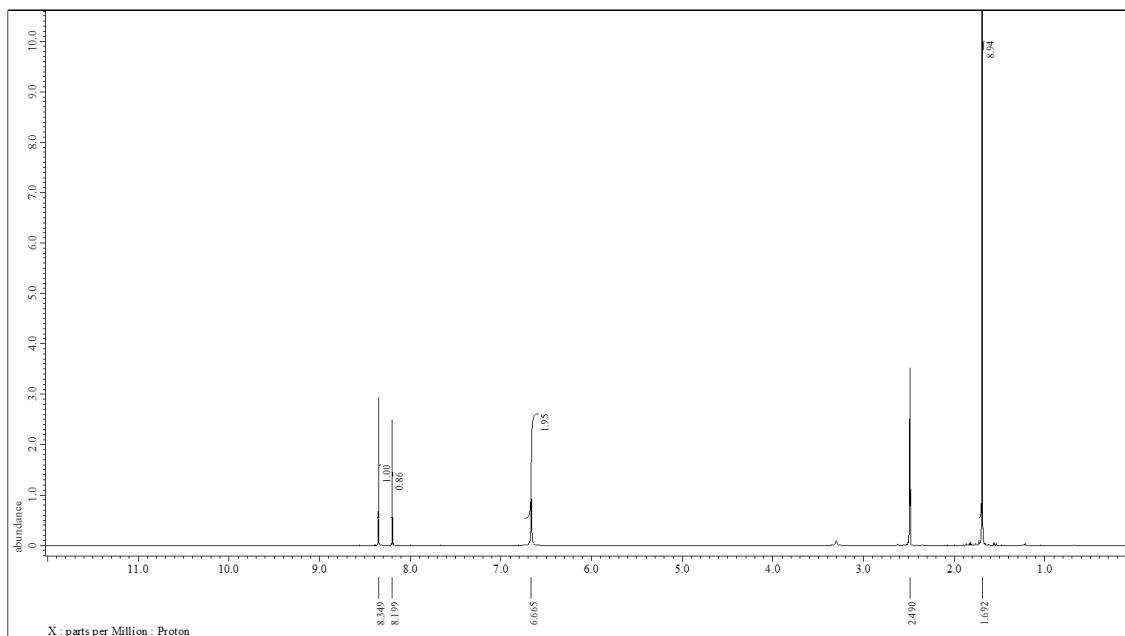
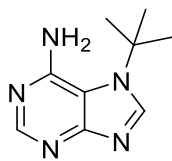
¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 6-azido-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin (**16**)



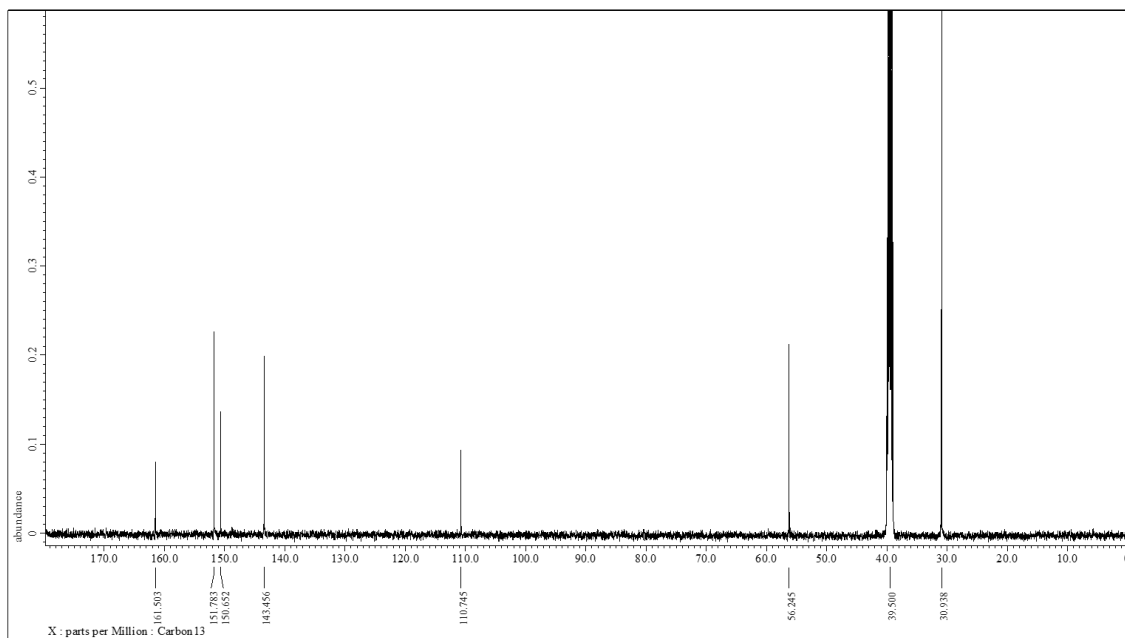
¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



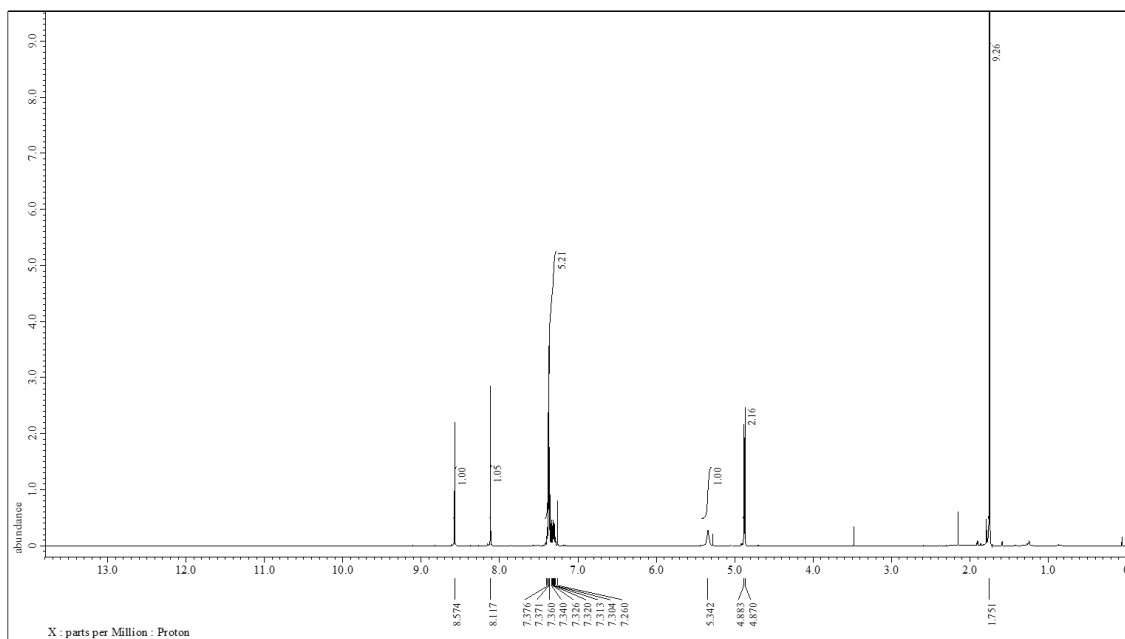
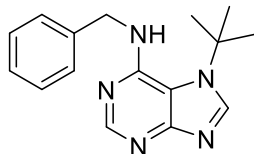
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-6-amin (**17**)



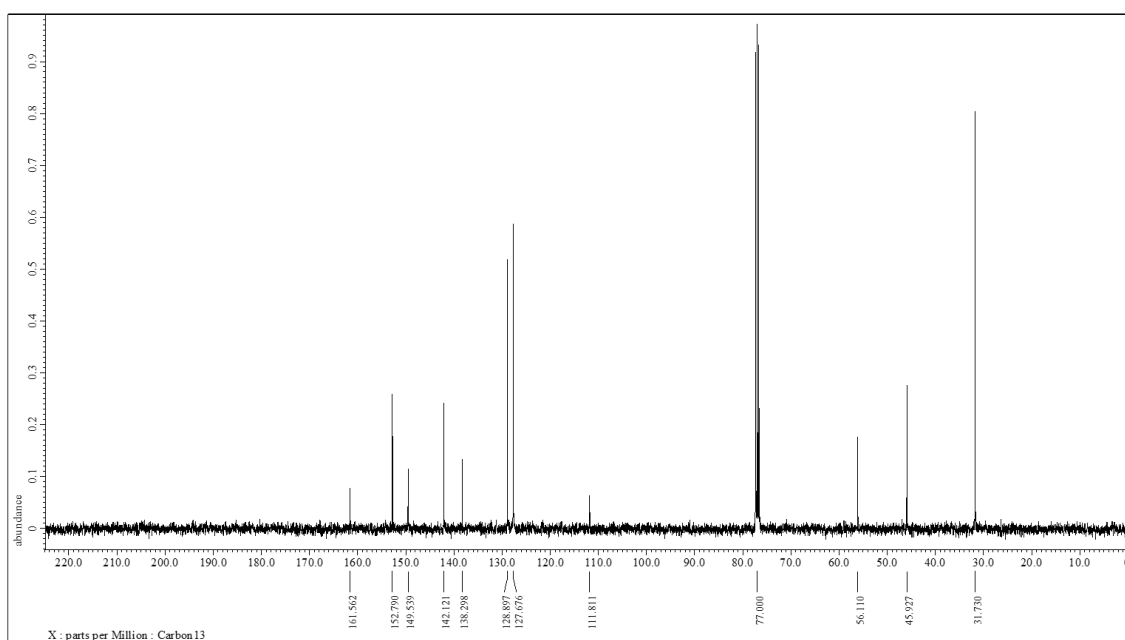
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



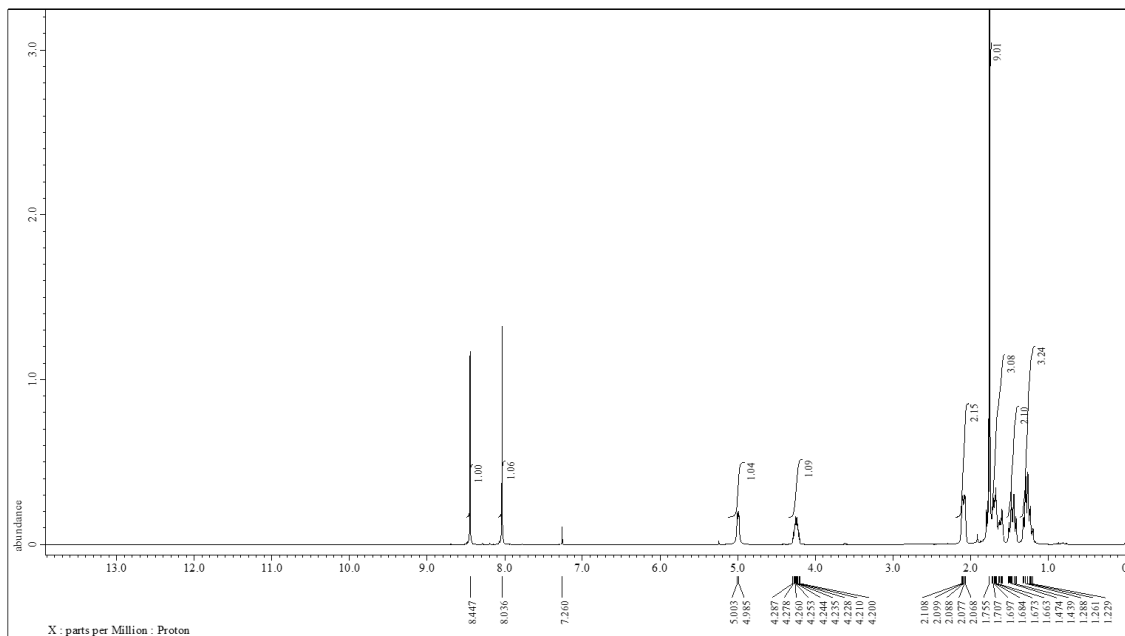
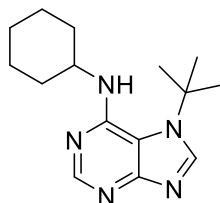
¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) *N*-benzyl-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-6-amin
(18)



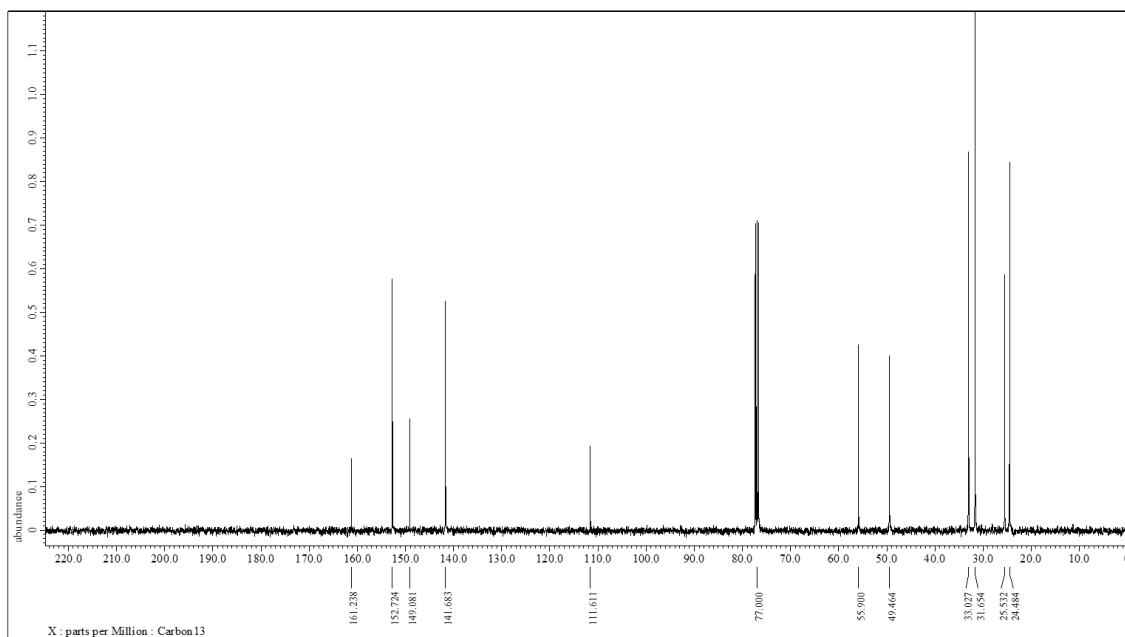
¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-*N*-cyclohexyl-7*H*-purin-6-amin
(19)

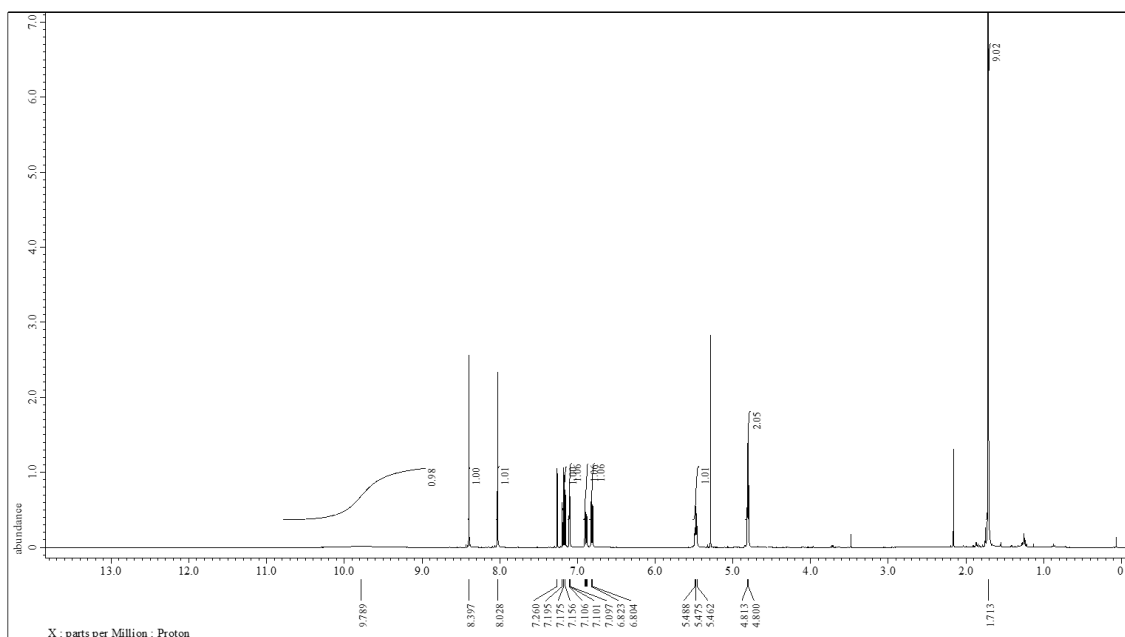
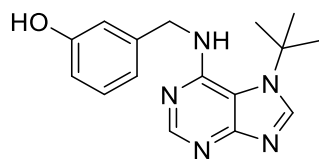


¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)

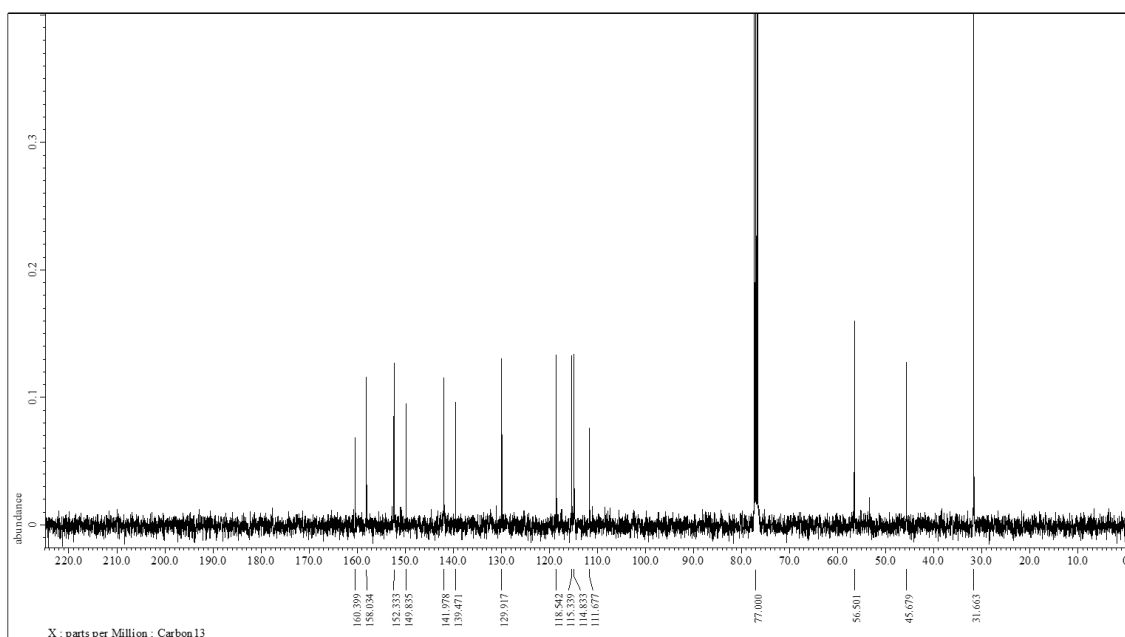


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)

3-(((7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-6-yl)amino)methyl)fenol (**20**)

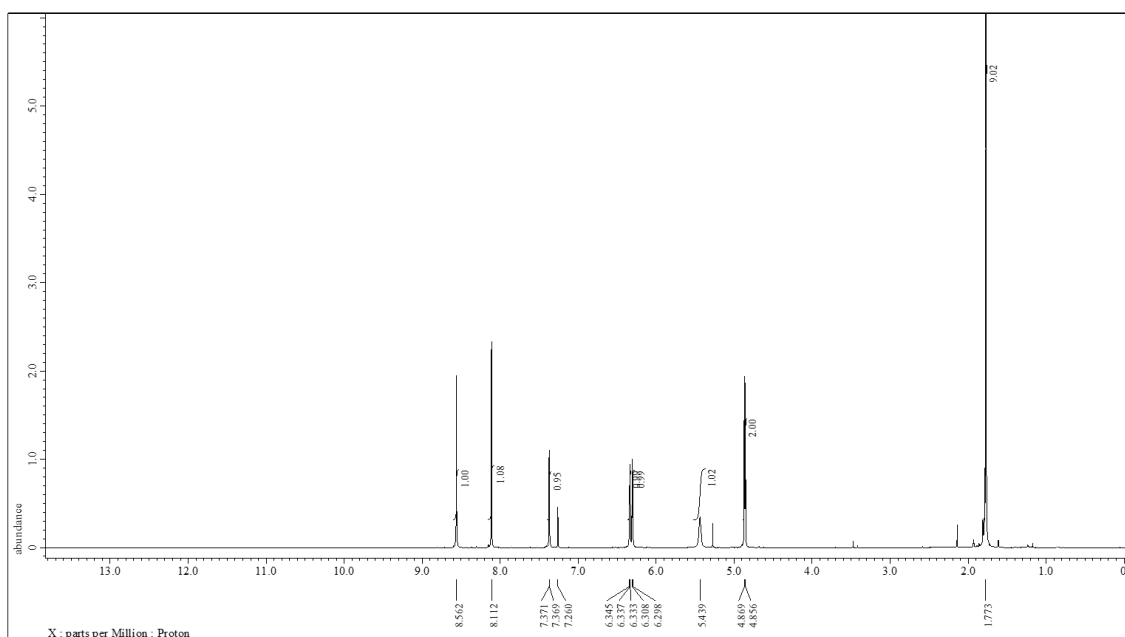
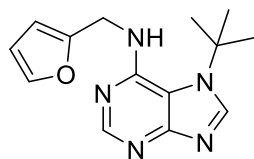


$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)

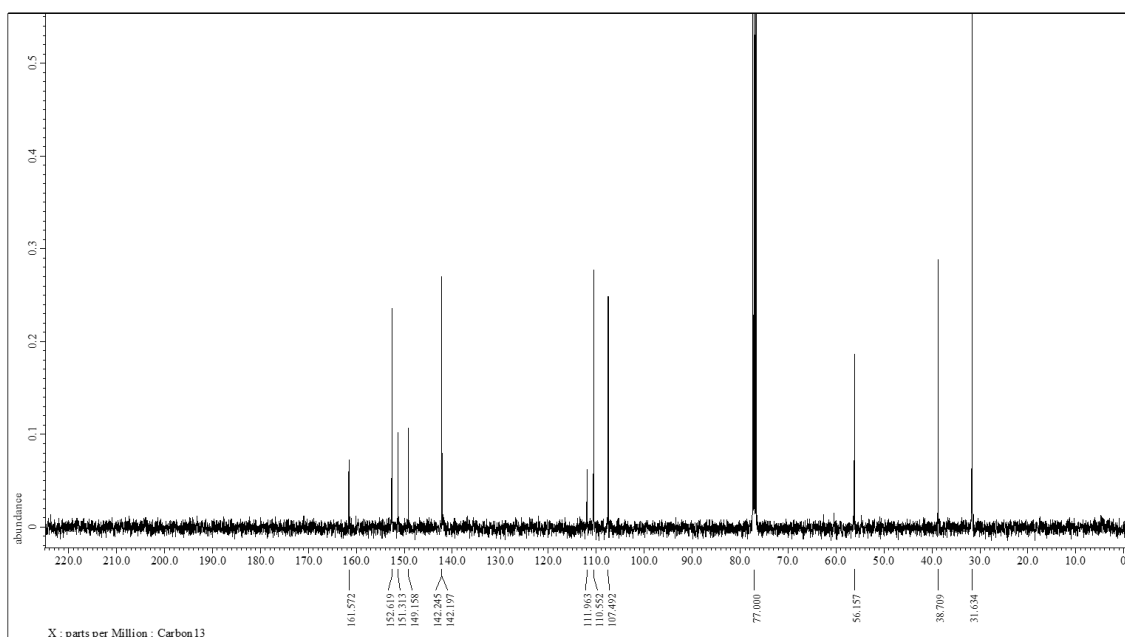


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)

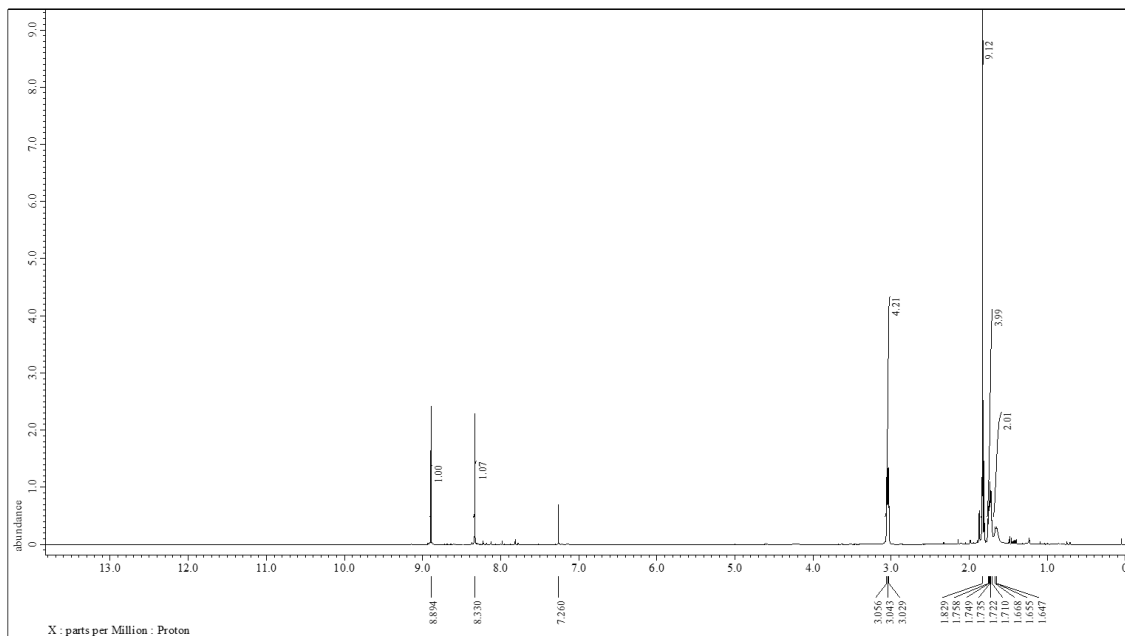
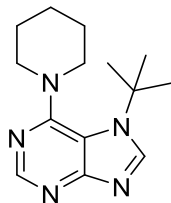
7-(*tert*-butyl)-*N*-(furan-2-ylmethyl)-7*H*-purin-6-amin (**21**)



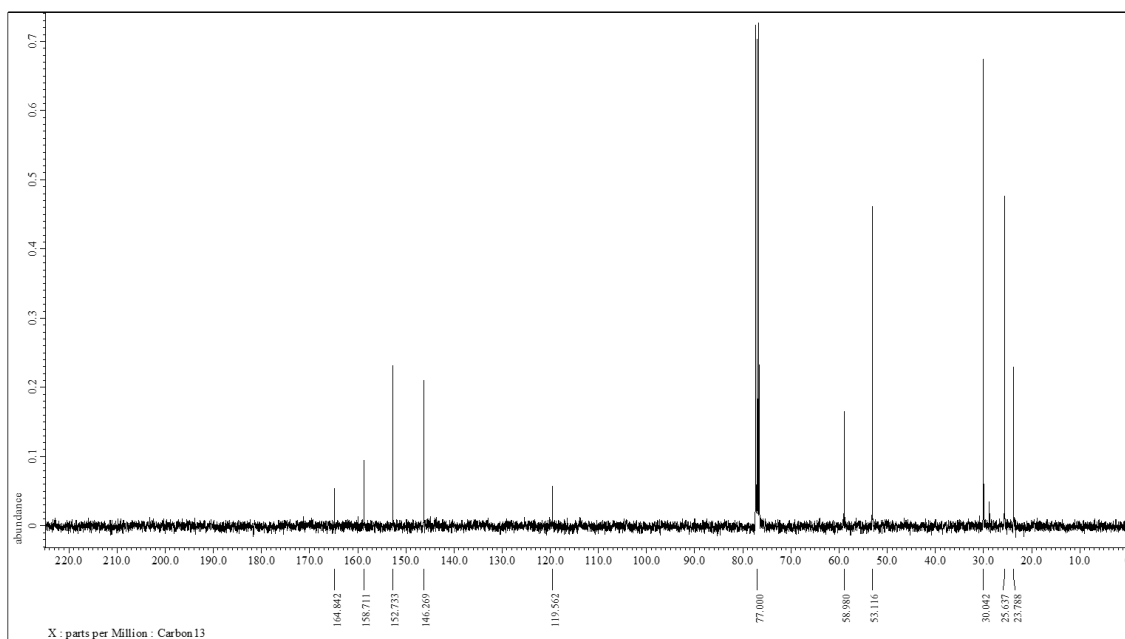
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-6-(piperidin-1-yl)-7*H*-purin
(22)

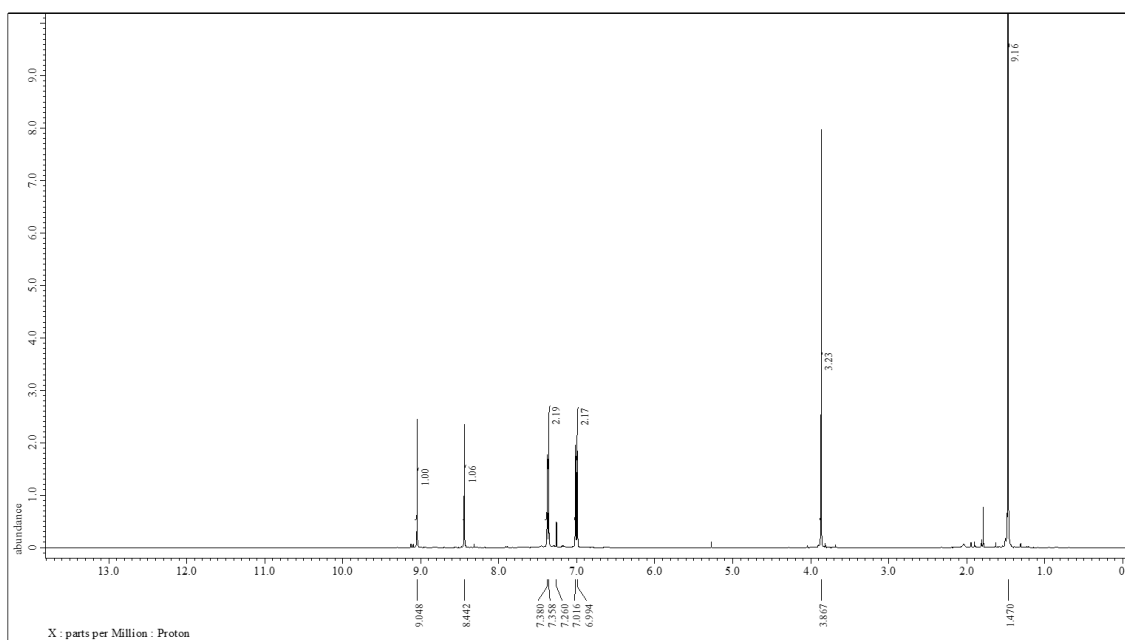
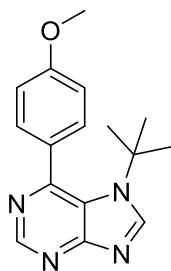


¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)

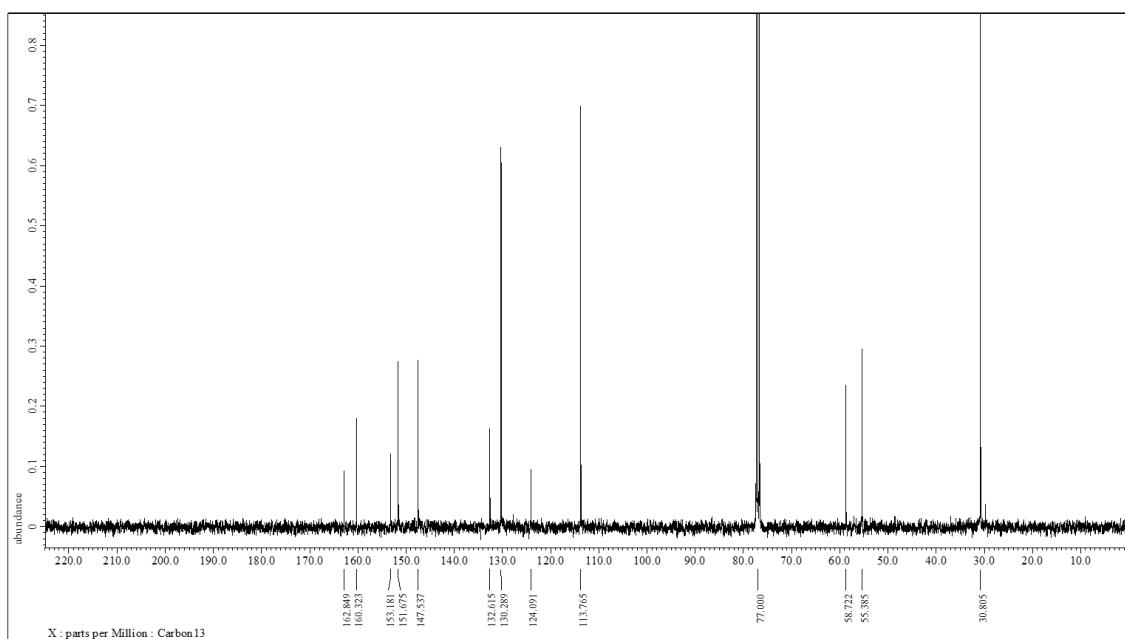


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*)

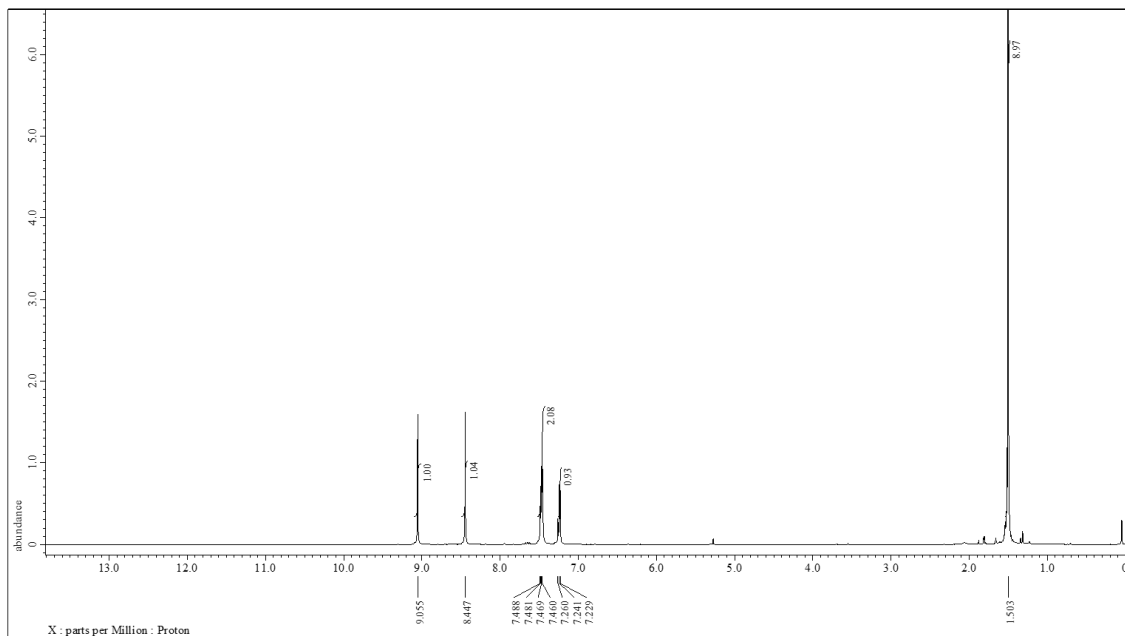
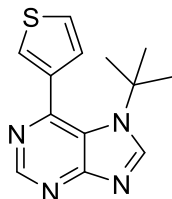
7-(*tert*-butyl)-6-(4-methoxyphenyl)-7*H*-purin (**24**)



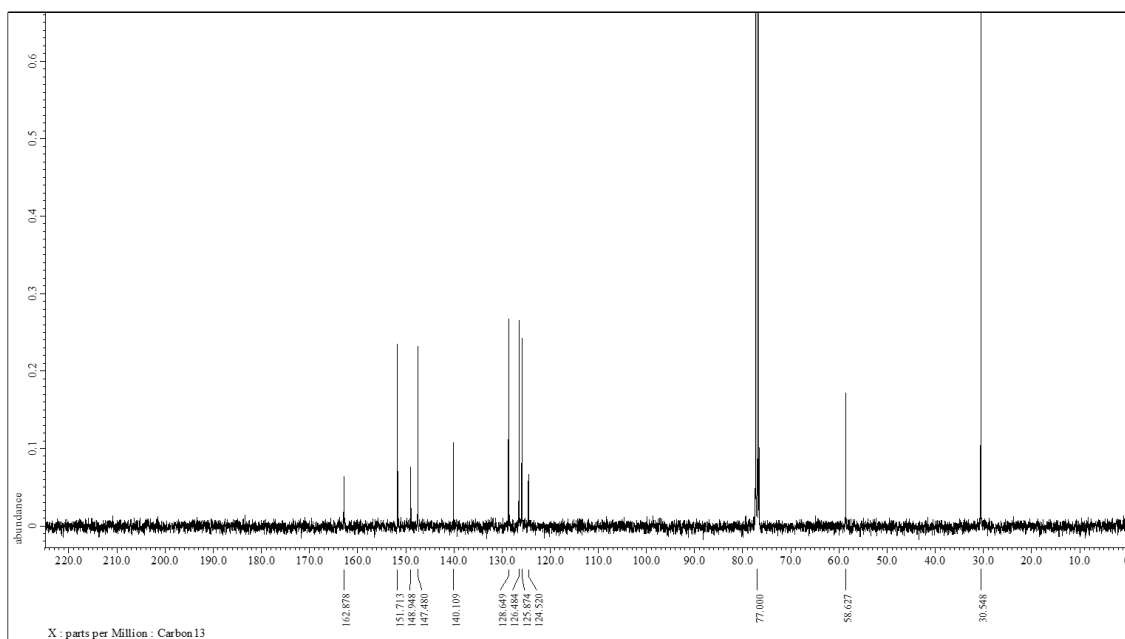
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)



¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*tert*-butyl)-6-(thiophen-3-yl)-7*H*-purin
(25)

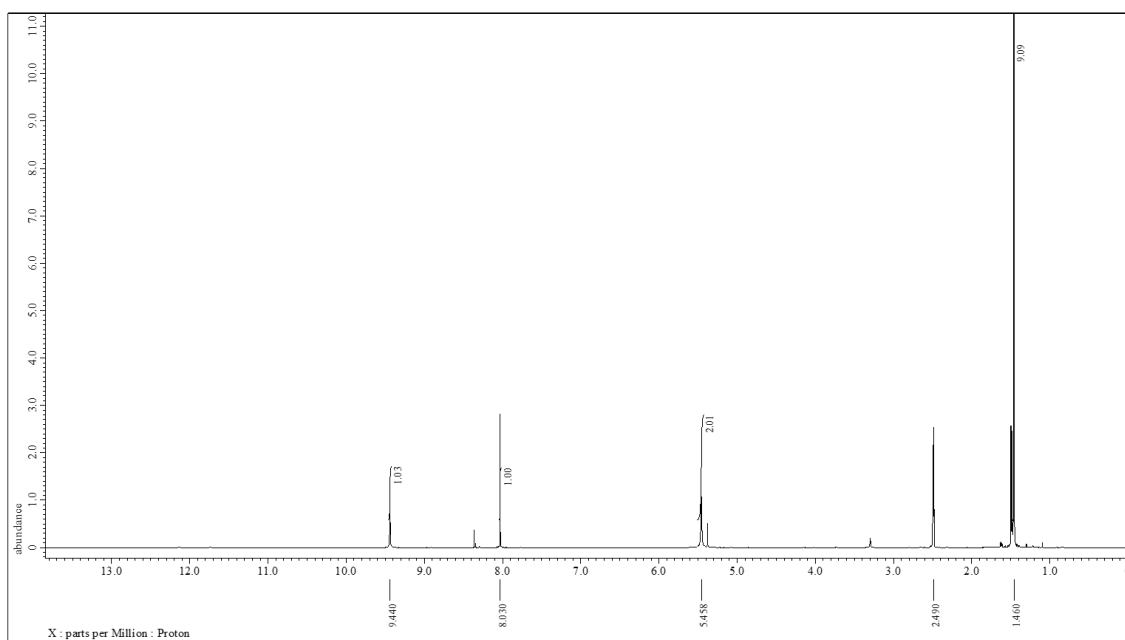
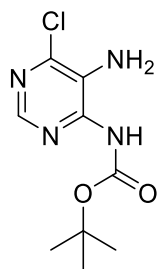


¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)

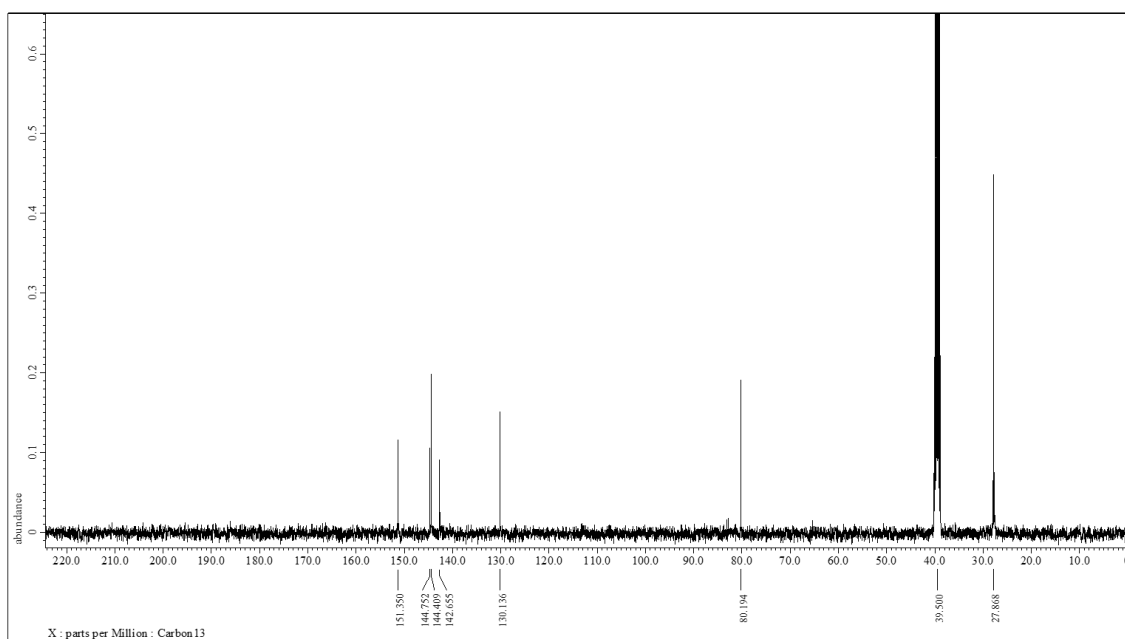


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

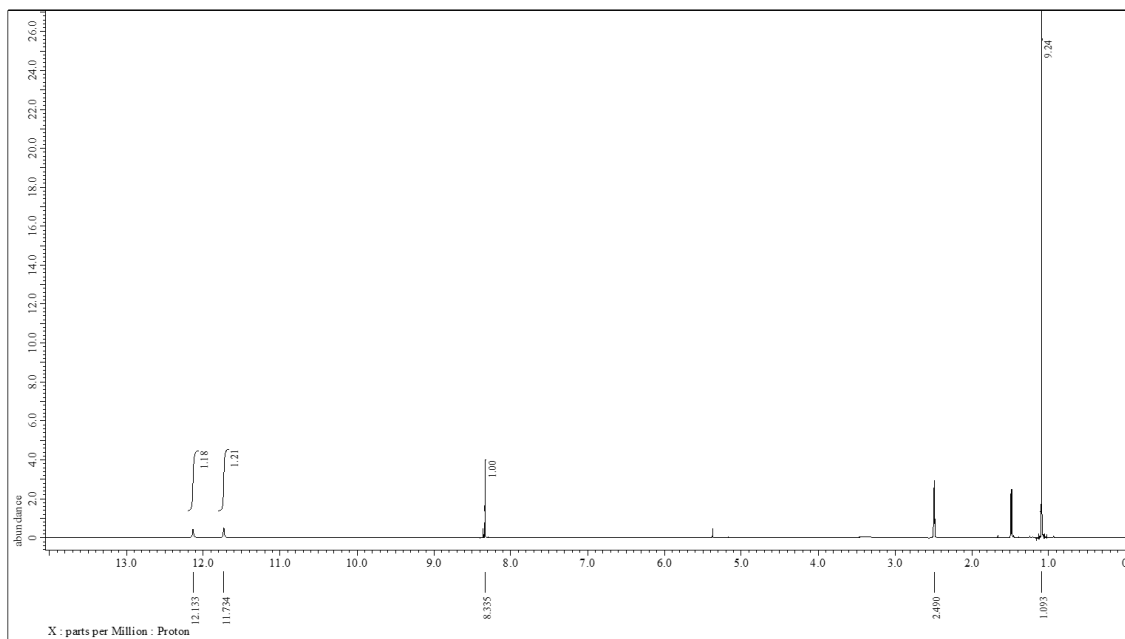
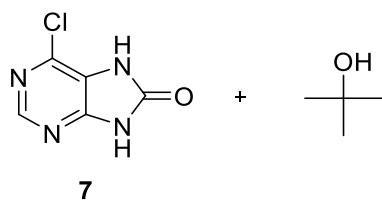
Terc-butyl-(5-amino-6-chloropyrimidin-4-yl)karbamát (6)



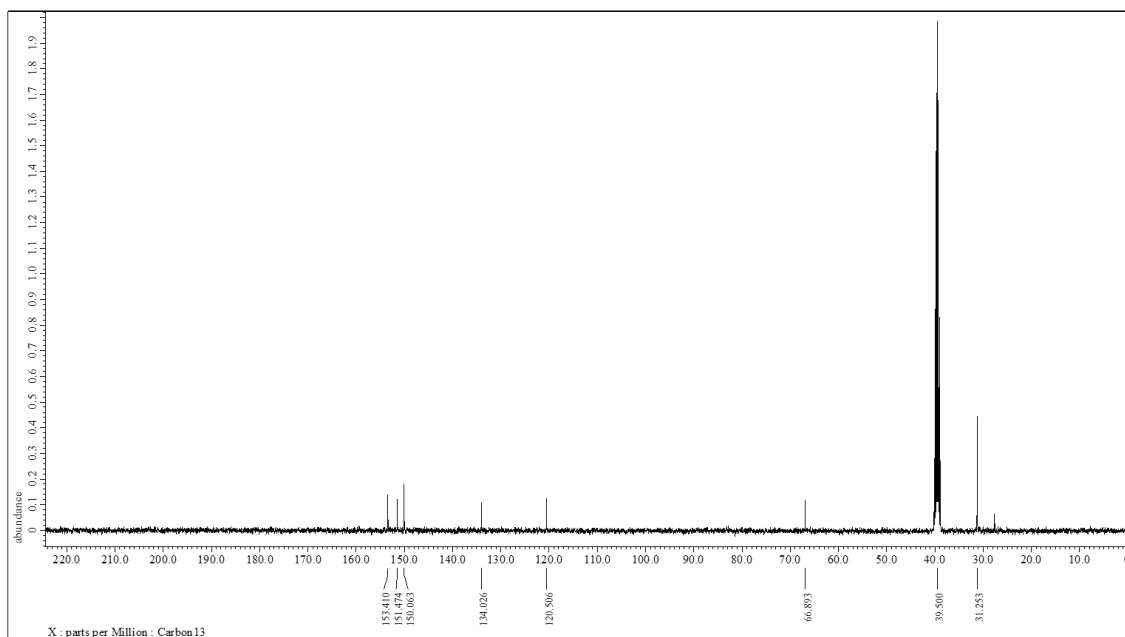
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



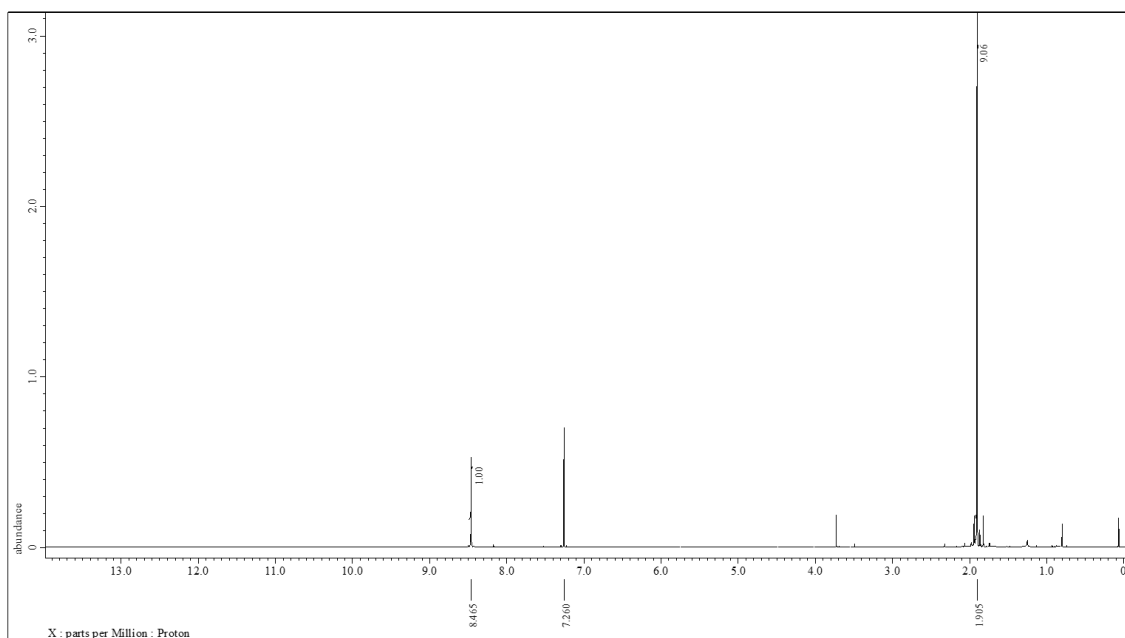
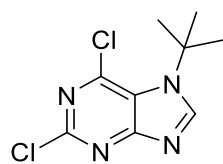
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 6-chloro-7,9-dihydro-8*H*-purin-8-on (**7**)



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) 7-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (**26**)



$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*)

