

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



David VANDA

**Příprava nových N^9 -substituovaných derivátů purinu pomocí
syntézy na pevné fázi**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Olomouc 2014

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce, doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D., za odbornou pomoc a vynikající vedení po celou dobu zpracovávání tématu, za poskytnutí důležitých rad v oblasti organických syntéz i mimo ně, za asistenci při vyhodnocování výsledků i konzultaci při samotném vypracovávání bakalářské práce a v neposlední řadě za obrovskou trpělivost. Také děkuji pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci, kteří mi pomohli při řešení problematiky vypracovávání bakalářské práce. Poděkování patří také mojí rodině za podporu po celou dobu studia.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně 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.

V Olomouci dne

.....

David Vanda

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	David Vanda
Název práce:	Příprava nových N ⁹ -substituovaných derivátů purinu pomocí syntézy na pevné fázi
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Školitel:	doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou nových derivátů purinu na pevné fázi. Cílem práce je vyvinout jednoduchou metodiku pro přípravu derivátů obsahujících v poloze N⁹ ligand se strukturním motivem pocházejícím z přírodní α -aminokyseliny. Těžiště práce spočívá také ve vývoji a optimalizaci jednotlivých reakčních kroků a úpravě podmínek pro průběžné reakce tak, aby byl výsledný produkt obdržen v co nejvyšší surové čistotě. Využití syntézy na pevné fázi je pro tento postup výhodné především proto, že vzhledem k jednoduché a rychlé izolaci všech meziproductů lze metodu využít pro rychlou přípravu setů derivátů (tzv. chemických knihoven) s použitím strategie kombinatoriální syntézy.

Klíčová slova: purin, aminokyseliny, syntéza na pevné fázi, heterocyklické sloučeniny

Počet stran: 45

Počet příloh: 7

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: David Vanda
Title: Solid phase synthesis of new N⁹-substituted derivatives of purine
Type of thesis: Bachelor
Department: Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Science at Palacky University, Olomouc
Advisor: doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.
The year of presentation: 2014
Abstract:

This bachelor degree work describes the solid phase synthesis of new derivatives of purine. The goal of this work is to develop a simple method for the preparation of derivatives that contain a ligand on N⁹ position with structural motif coming from natural α -amino acid. The main part of the work consists in the development and optimization of individual reaction steps and on adjusting the conditions for single reactions so that the final product would be received in the high crude purity. Using the solid phase synthesis for this procedure is profitable mostly because thanks to the simple and fast isolation of all intermediates this method can be used for a quick preparation of derivatives sets (a.k.a. chemical libraries) with using the strategy of combinatorial synthesis.

Keywords: purine, amino acids, solid phase synthesis, heterocyclic compounds

Number of pages: 45

Number of appendixes: 7

Language: Czech

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl bakalářské práce	8
3. Teoretická část	9
3.1 Standardní možnosti přípravy purinů	9
3.1.1 Úvod do purinových derivátů	9
3.1.2 Možnosti výstavby purinového skeletu v roztoku	9
3.1.3 Možnosti výstavby purinového skeletu na pevném nosiči	11
3.2 Vybrané deriváty purinu a jejich biologická aktivita	14
3.2.1 Přírodní deriváty	14
3.2.1.1 Purinové báze v nukleových kyselinách	14
3.2.1.2 Xanthiny	15
3.2.1.3 Kyselina močová	16
3.2.2 Syntetické deriváty	17
3.2.2.1 Entecavir	17
3.2.2.2 Olomoucín, roscovitin, purvalanol	17
3.2.2.3 Aciclovir	18
3.2.2.4 Tenofovir, adefovir	19
3.2.2.5 Cladribin, fludarabin, pentostatin	20
3.2.2.6 Další deriváty	21
3.3 Obecný postup syntézy na pevné fázi	21
3.3.1 Pevné nosiče	22
3.3.2 Linkery	23
4. Výsledky a diskuze	25
4.1 Popis zvolené syntetické cesty	26
4.1.1 Příprava výchozí imobilizované aminokyseliny	27
4.1.1.1 Ukotvení BAL linkeru	27
4.1.1.2 Reduktivní aminace	28
4.1.1.3 Imobilizace aminokyseliny	28
4.1.2 Arylace s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem	29
4.1.3 Aminace na pyrimidinový kruh	30
4.1.4 Redukce nitro skupiny na amino skupinu	30

4.1.5	Finální cyklizace	31
4.2	Odštěpení a purifikace finálních produktů	31
4.3	Přehled připravených látek	33
5.	Experimentální část	34
5.1	Přístroje a metody	34
5.2	Štěpení vzorku z pevné fáze a následná analýza	35
5.2.1	Štěpení vzorku a příprava k analýze	35
5.2.2	Obecný postup pro stanovení loadingu při kvantifikaci	35
5.3	Syntéza na aminomethylové pryskyřici	36
5.3.1	Ukotvení BAL linkeru	36
5.3.2	Reduktivní aminace	36
5.3.3	Imobilizace aminokyseliny	37
5.3.4	Arylace 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem	38
5.3.5	Aminace sekundárním aminem	38
5.3.6	Redukce nitro skupiny	39
5.3.7	Cyklizace s aldehydem	39
5.3.8	Finální štěpení, purifikace a NMR měření	40
6.	Závěr	42
7.	Použité zkratky	43
8.	Literatura	44

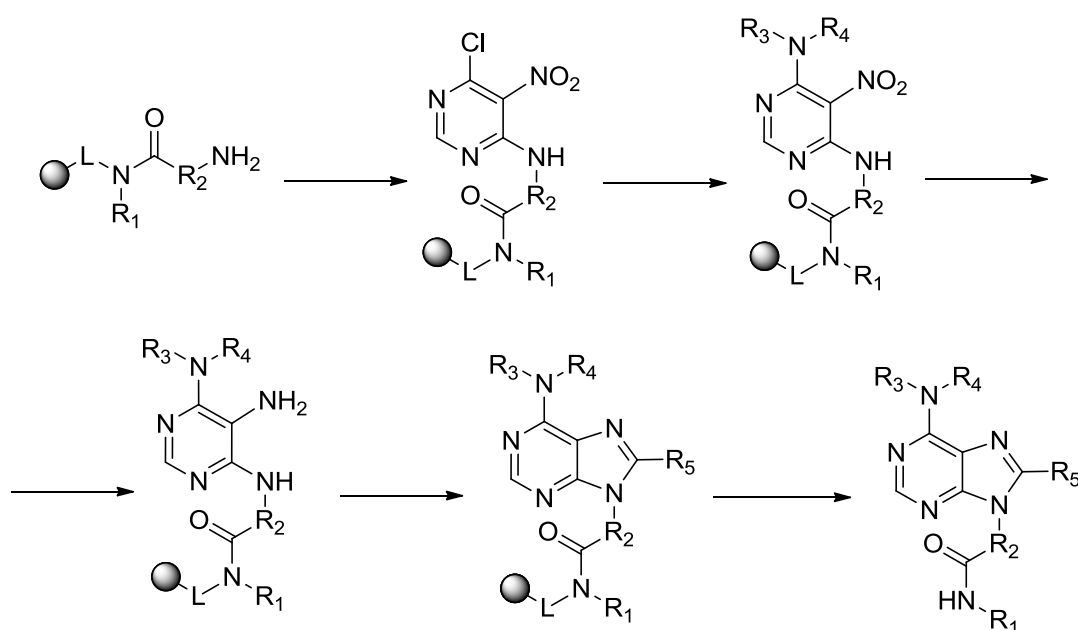
1. Úvod

Je známo, že purin jako základ struktury nukleových kyselin a řady biologicky aktivních látek je pravděpodobně nejzkoumanějším heterocyklem vůbec. V literatuře je popsáno kvantum rozličných derivátů s proměnlivou substitucí v polohách 2, 6, 8 a 9, přičemž u řady připravených sloučenin byla nalezena rozmanitá biologická aktivita. V současné době je na výzkum a vývoj látek obsahujících purinové jádro kladen stále větší důraz. I přes množství dostupných informací je však možné vysledovat určité strukturní omezení týkající se polohy N⁹ v tom smyslu, že většina dosud studovaných sloučenin obsahuje v této poloze jako substituent pouze jednoduchý alifatický nebo alicyklický řetězec. Příprava a studium derivátů obsahujících v dané poloze funkcionalizovaný ligand byla v literatuře popsána pouze ojediněle. Výjimku tvoří acyklické nukleosidy, které v diskutované poloze obsahují hydroxyalkylové substituenty nebo etherické vazby.

Tento fakt se stal motivací pro navržení jednoduché syntetické metody umožňující importovat do polohy N⁹ ligand s karboxamidovou skupinou. Takové deriváty lze principiálně připravit např. z aminokyselin, kde dusík aminoskupiny se při výstavbě molekuly stává součástí skeletu v poloze N⁹ a karboxylová skupina tvoří základ pro přípravu amidické funkce. V našem případě byly jako výchozí sloučeniny pro přípravu zvoleny přírodní α -aminokyseliny, které (podobně jako molekula purinu) představují privilegovaný motiv v biologicky aktivních sloučeninách přírodního i syntetického původu.

2. Cíl bakalářské práce

Cílem práce je vyvinout jednoduchou metodu přípravy derivátů purinu obsahujících v N⁹ poloze ligand mající základ ve struktuře přírodních aminokyselin. Základní strukturou, ze které reakční schéma vychází, je právě imobilizovaná aminokyselina, která je na polymerní nosič ukotvena ve formě amidu pomocí acylace imobilizovaného sekundárního aminu. Následná výstavba purinového skeletu by měla vést k finálním derivátům s proměnlivou substitucí R₁ - R₅.



Obečné schéma přípravy cílových derivátů (1).

Jako metoda přípravy cílových sloučenin byla zvolena syntéza na pevné fázi z důvodu snadného spojení s kombinatoriální chemií.

3. Teoretická část

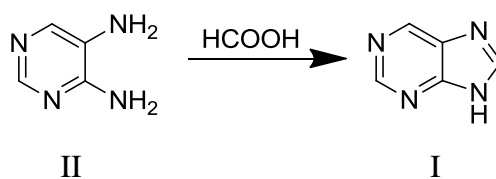
3.1 Standardní možnosti přípravy purinů

3.1.1 Úvod do purinových derivátů

Purinový skelet je jako takový jedním z nejčastěji se vyskytujících heterocyklů. Je přítomen v řadě biologických molekul, ve struktuře DNA, a také v množství biologicky aktivních látek s nejrůznějším zaměřením. V této kapitole je popsáno několik možností samotné syntézy purinového jádra a derivátů od něj odvozených. Také bylo vybráno několik významných sloučenin obsahujících purin jako základní strukturu a popsána jejich příprava a základní informace o těchto látkách.

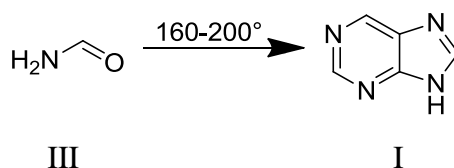
3.1.2 Možnosti výstavby purinového skeletu v roztoku

V dnešní době je známa spousta metod, kterými lze připravit samotný skelet purinu (I). Většina přitom využívá cyklizačních reakcí. Významnou reakcí je syntéza vycházející z 4,5-diaminopyrimidinu (II), který je zahříván s kyselinou mravenčí¹ (Schéma 1).



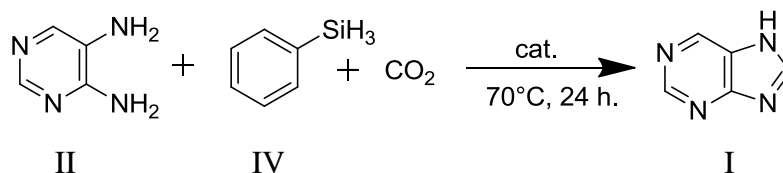
(Schéma 1)

Mezi další možné metody přípravy patří syntéza purinu z formamidu (III), která běží v jednom kroku při vyšších teplotách² (Schéma 2).



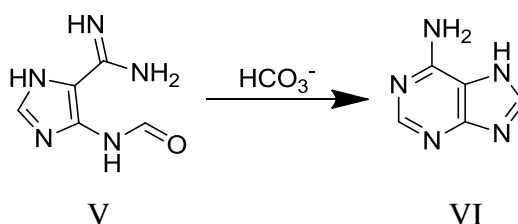
(Schéma 2)

Cyklizaci 4,5-diaminopyrimidinu lze provádět i katalyzovanou deoxygenací oxidu uhličitého s následným zabudováním uhlíku z molekuly CO₂ do polohy C⁸ v purinovém skeletu. Jako reduktant se pro tuto reakci využívá fenylsilan (IV)³ (Schéma 3).



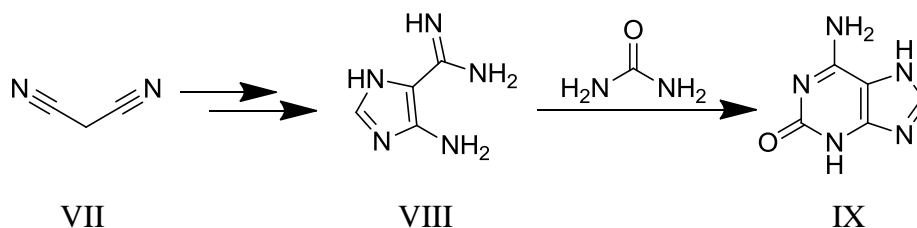
(Schéma 3)

Většina dnes používaných reakcí využívá takových postupů, kdy je výsledný purin na některém místě již substituován. Příkladem takovéto reakce je cyklizace na 4-formamido-5-imidazolkarboxamidu (V), kdy výsledným produktem je adenin (VI) (Schéma 4).



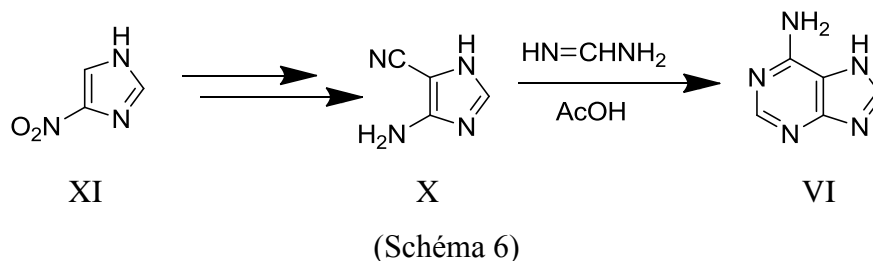
(Schéma 4)

Tento derivát imidazolu (V) pro výše zmíněnou reakci lze připravit v několika krocích z malononitrilu (VII), přičemž nemusí bezpodmínečně vznikat pouze adenin. Lze například využít i jeden z meziproduktů reakce, podobný derivát imidazolu (VIII), který v podobě dihydrochloridu reakcí s močovinou dává isoguanin⁴ (IX) (Schéma 5).

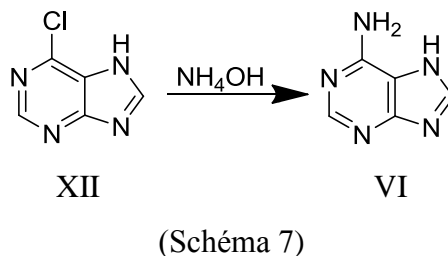


(Schéma 5)

Obdobnou cyklizační reakci lze také provést z dalšího derivátu imidazolu (X), který obsahuje nitrilovou skupinu. Tuto výchozí látku lze získat v několika krocích z nitroimidazolu (XI). Produktem cyklizace je adenin⁵ (Schéma 6).



Zdaleka nejpoužívanějšími reakcemi, jejichž produkty jsou různě substituované puriny, jsou reakce, které využívají modifikace již vhodně substituovaného purinového skeletu. Nejčastější metody vycházejí z halogenderivátů purinu. Halogenové ligandy jsou snadno nahraditelné jinými skupinami, což umožňuje rychlou a efektivní syntézu cílových struktur. Jednoduchým příkladem je aminace 6-chlorpurinu (XII) působením hydroxidu amonného, která dává jako produkt opět adenin⁶ (Schéma 7).

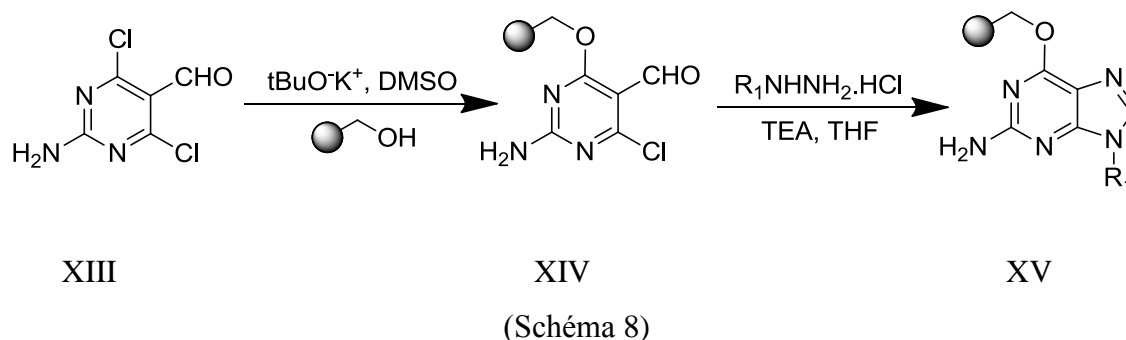


3.1.3 Možnosti výstavby purinového skeletu na pevném nosiči

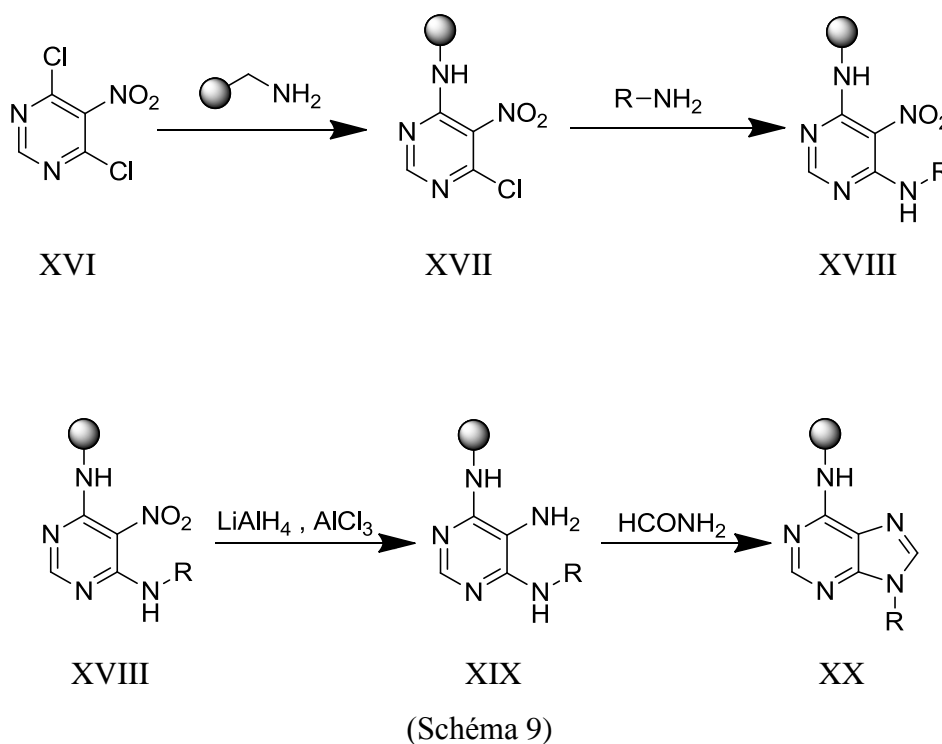
Syntéza na pevné fázi se příliš neliší od klasické syntézy - používají se podobné výchozí látky a mechanismy reakcí. Hlavní výhodou je ale možnost rychlé přípravy velkého množství látek. Toho lze dále využít v kombinatoriální chemii, což je hlavním důvodem, proč se využívá polymerních nosičů pro organickou syntézu.

Základní přípravu purinového skeletu můžeme provádět např. na Wangově pryskyřici s použitím 2-amino-4,6-dichlorpyrimidin-5-karbaldehydu (XIII), který lze

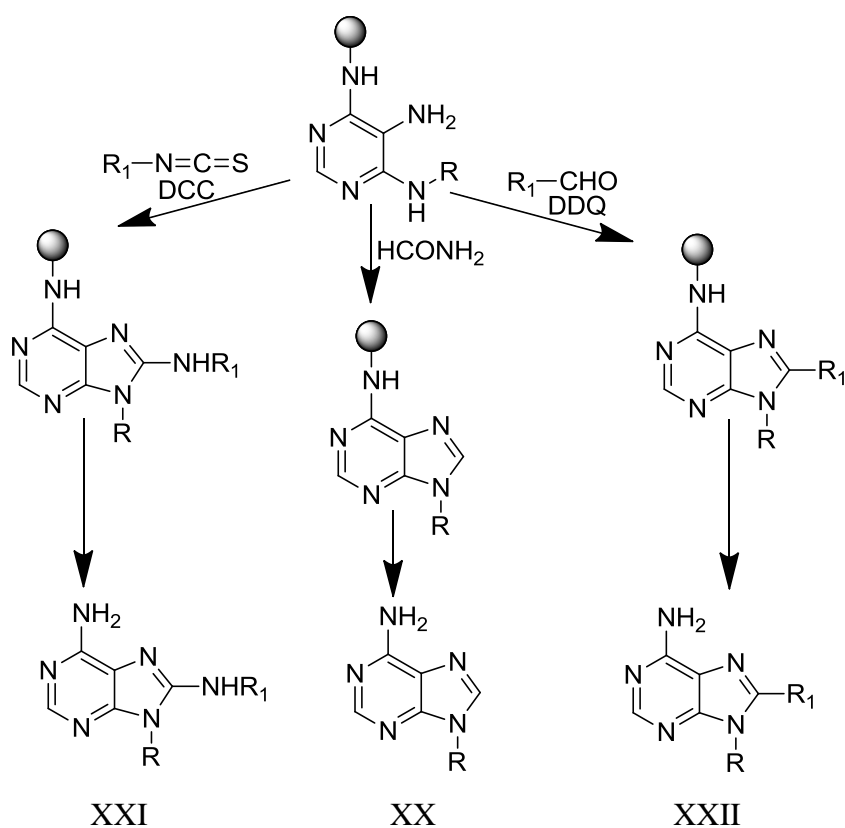
na tento nosič ukotvit (XIV), a poté provést cyklizační reakci pomocí substituovaného hydrazinu na konečný produkt⁷ (XV) (Schéma 8).



Dalším klasickým příkladem solid-phase syntézy purinové kostry je reakce využívající 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin (XVI), který je ukotven na Rinkovu amidovou pryskyřici (XVII). Ten pak podléhá reakci s aminem, který atakuje heterocyklický skelet a nahradí zbývající chlor (XVIII), do jehož polohy se tímto krokem dostane amin s takovým uhlovodíkovým zbytkem -R, který má být ve finální struktuře ligandem v poloze N⁹. Poté je vhodným činidlem zredukována zbývající nitroskupina na aminoskupinu (XIX) a nakonec provedena cyklizace, která uzavře purinové jádro (XX) (Schéma 9).



Finální cyklizace pak může být provedena několika různými činidly. Má-li být v cílové purinové struktuře substituent i na C⁸ poloze, lze použít například isothiokyanáty nebo aldehydy s uhlovodíkovým zbytkem, který po cyklizaci tvoří právě C⁸ ligand. Každá z těchto cyklizačních metod dává jinak substituovanou heterocyklickou sloučeninu mající jako strukturní základ adenin⁸ (XX, XXI, XXII, aj.) (Schéma 10).

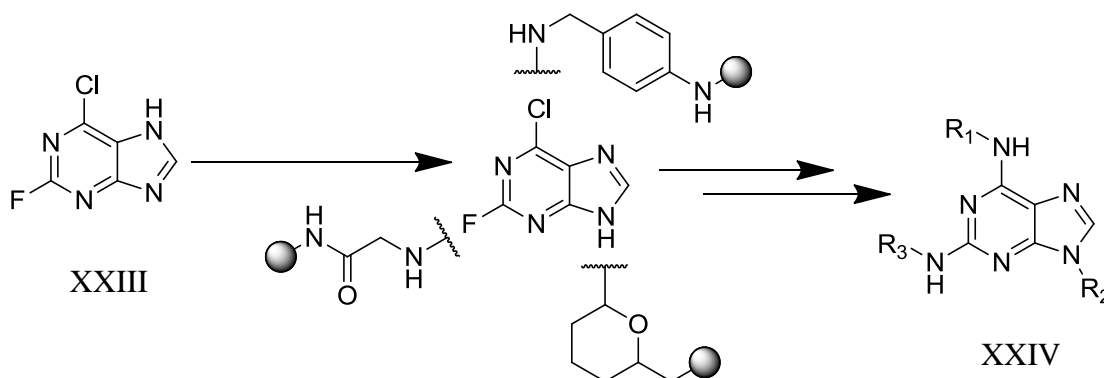


(Schéma 10)

Jako substituenty R a R₁ v těchto molekulách přitom slouží z velké části pouze jednoduché uhlovodíkové zbytky (methyl, ethyl, isobutyl).

Purinové deriváty připravované na pevné fázi mají zpravidla skelet již substituovaný jednou nebo více ligandy, které lze jednoduchými reakcemi odštěpit nebo nahradit jiným požadovaným substituentem. Reakce takto probíhající jsou přitom analogické jako při roztokové syntéze. Pokud je jako výchozí látka použit 6-chlor-2-fluorpurin (XXIII), lze jej ukotvit na různé druhy polymerních nosičů do poloh 2, 6 nebo 9. Následnou aminací a alkyací lze pak atakovat zbývající dvě polohy a vytvořit

tak velké množství 2,6,9-trisubstituovaných purinů (XXIV), které mohou sloužit jako základ chemických knihoven⁹ (Schéma 11).



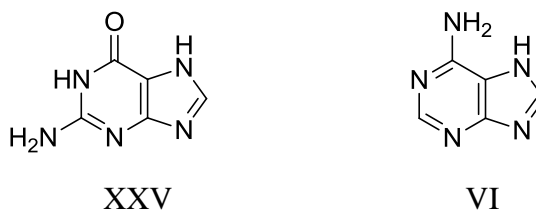
(Schéma 11)

3.2 Vybrané deriváty purinu a jejich biologická aktivita

3.2.1 Přírodní deriváty

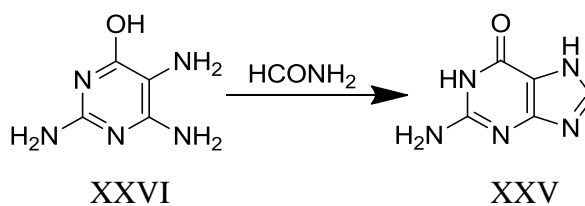
3.2.1.1 Purinové báze v nukleových kyselinách

V moderní chemii je známo široké spektrum látek obsahujících ve struktuře purinové jádro. Mezi základní přírodní sloučeniny patří nukleové báze v DNA savců. Purinový skelet je zde přítomen v guaninu (XXV) a adeninu (VI) (Schéma 7).



(Schéma 12)

Syntéza těchto látek je zpravidla jednoduchá. Syntéza adeninu je zpracována výše (Schéma 3). Pro syntézu guaninu lze použít obdobnou reakci z výstavby heterocyklického skeletu, kdy lze opět provést cyklizaci 2,5,6-triamino-4-hydroxypyrimidinu (XXVI) formamidem¹⁰ (Schéma 13).

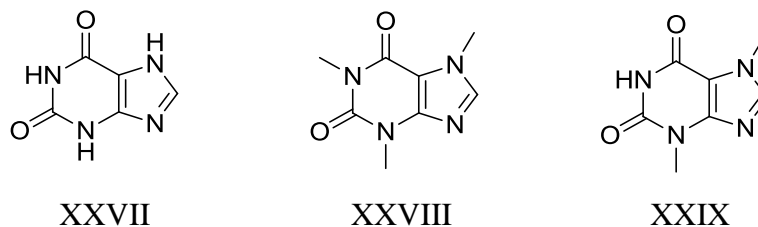


(Schéma 13)

Tyto purinové báze spolu s pyrimidinovými bázemi základními stavebními bloky, které pomocí vodíkových vazeb udržují strukturu šroubovice DNA¹¹.

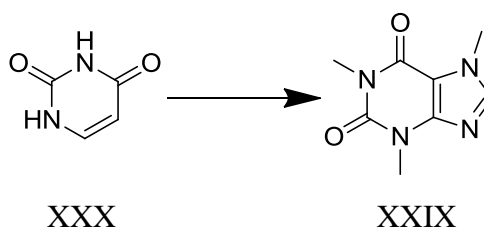
3.2.1.2 Xanthiny

Další zajímavou skupinou derivátů purinu jsou látky odvozené od xanthinu (XXVII). Ten lze přímo bez substituentů připravit podobnými podmínkami jako např. guanin¹² (Schéma 13). Důležitější z hlediska působení na organismus jsou ale hlavně methylové deriváty, mezi které patří například kofein (XXVIII) nebo theobromin (XXIX) (Schéma 14).



(Schéma 14)

Při syntéze těchto derivátů lze vycházet například z uracilu (XXX), ze kterého lze přes několik reakčních kroků využívajících redukční a cyklizační reakce podobné při výstavbě purinového skeletu připravit finální strukturu kofeinu¹³ (Schéma 15).

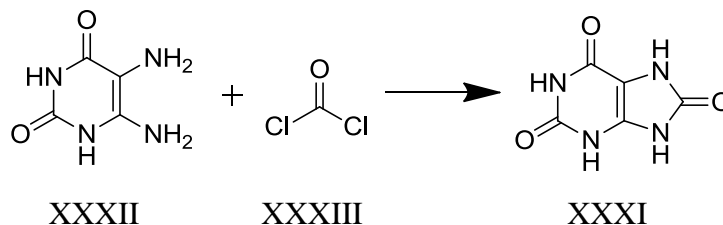


(Schéma 15)

Kofein a theobromin lze v přírodě najít ve více než 60 druzích rostlin (např. *Coffea arabica*, *Theobroma cacao*, ...). Účinky kofeinu jsou lidstvu dlouhodobě známé, mezi hlavní vlivy na organismus patří stimulace centrálního nervového systému, zrychlení tepu a mozkové cirkulace a mimo jiné také vasodilatace. Theobromin se přímo používá ve farmacii jako vasodilatancium. Při vyšší dávce u kofeinu pak dochází k nespavosti, nervozitě, zvonění v uších až lehkému deliriu. Toxické účinky při extrémní dávce jsou zvracení, žaludeční bolesti a záchvaty. Smrtná dávka v lidském těle je nad 100 µg/ml krve. Kofein se v organismu neusazuje a po několika hodinách je z těla vyloučen^{14,15}.

3.2.1.3 Kyselina močová

Mezi další významné deriváty purinu objevené v přírodě patří kyselina močová (XXXI). Tu je možné připravit z 5,6-diaminouracilu (XXXII) zahříváním s fosgenem (XXXIII) v bazickém prostředí (Schéma 16).



(Schéma 16)

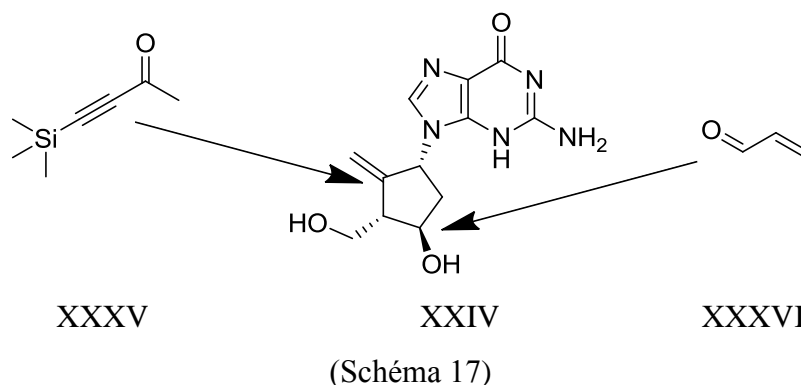
Kyselina močová je finálním metabolickým produktem v tělech savců, kde vzniká odbouráváním purinů. Rizikovými faktory jsou převážně obezita, vysoká konzumace alkoholu, vysoký krevní tlak apod., přičemž alkohol patří mezi nejdůležitější, protože urychluje degradaci adeninových nukleotidů. Hlavním problémem, který způsobuje vysoká hladina kyseliny močové v krvi, neboli hyperurikémie, je tvorba solí (urátů) se sodným kationtem, což při nedostatečném odbourávání nebo nadprodukci vede ke krystalizaci a riziku dny^{16,17}.

3.2.2 Syntetické deriváty

Ze syntetických purinových derivátů je v této práci kladen důraz především na látky, které mají nahrazen vodík na dusíku v N⁹ poloze, a které vykazují zajímavou biologickou aktivitu.

3.2.2.1 Entecavir

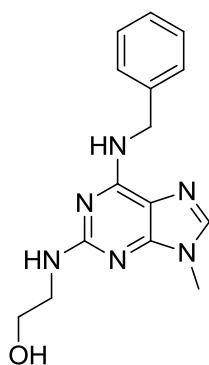
Mezi jednu z důležitých látek patřících do skupiny purinů patří entecavir (XXXIV). Jeho strukturu lze postupně vystavět tak, že se využije 4-trimethylsilyl-3-butyn-2-onu (XXXV) a akroleinu (XXXVI), které vytvoří požadovaný substituent, na který je poté zavěšen derivát purinu¹⁸ (Schéma 17).



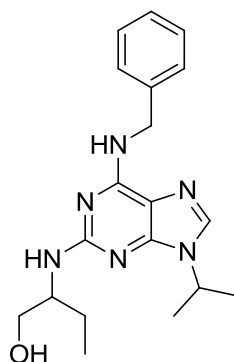
Entecavir je selektivním inhibítorem pro enzymy DNA ve viru hepatitidy B (HBV). Cíleně se zaměřuje na inhibici DNA polymerasy, čímž potlačuje hrozbu hepatocelulárního karcinomu, který může u pacientů trpících hepatitidou B způsobit zdravotní komplikace, které mohou způsobit smrt¹⁹.

3.2.2.2 Olomoucín, roscovitin, purvalanol

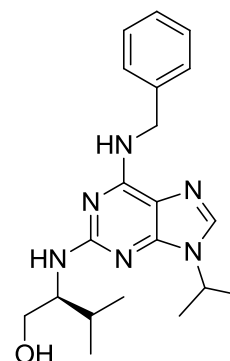
Dalšími velmi podrobně zkoumanými deriváty obsahující substituent na posledním purinovém dusíku jsou olomoucín (XXXVII), roscovitin (XXXVIII) a purvalanol (XXXIX) (Schéma 18).



(XXXVII)



(XXXVIII)



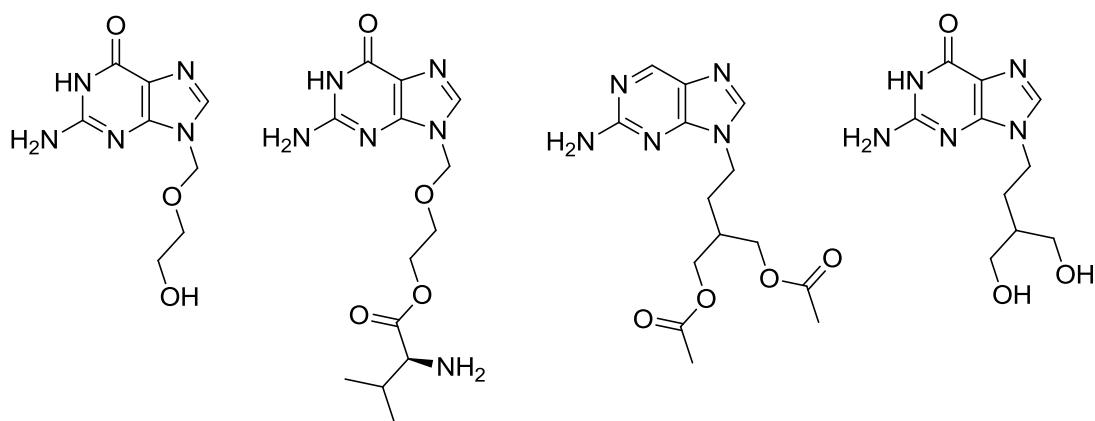
(XXXIX)

(Schéma 18)

Tyto látky lze efektivně připravit i pomocí syntézy na pevné fázi. Svou biologickou aktivitou jsou známy především jako selektivní inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDK), které jsou zodpovědné za buněčné dělení, a tím pádem mohou způsobovat různé zdravotní potíže, převážně však nádorové bujení buněk. Tyto látky fungují mimo jiné jako kompetitivní inhibitory v ATP (to je zajištěno díky podobnostem v purinovém skeletu) a nekompetitivní inhibitory histonu H1, což umožňuje kontrolu nad buněčným cyklem. Díky svému víceúčelovému působení v organismu jsou tyto látky používány jako multiselektivní léčiva^{20,21,22,23,24}.

3.2.2.3 Aciclovir

Aciclovir (XXXX) je velmi účinná látka řadící se mezi antivirotika. Nejčastěji se využívá u herpetických virů, např. herpes simplex. Aciclovir se v těle metabolizuje na fosfátové formy a inhibuje tak replikaci viru, příp. přímo činnost DNA polymerasy. Od jeho objevení je hojně používán, byla také vyvinuta řada jeho derivátů, které vykazují podobné účinky, např. valaciclovir (XXXXI), famciclovir (XXXXII), penciclovir (XXXXIII) (Schéma 19) aj. Tyto deriváty byly vyvíjeny převážně pro zvýšení biologické dostupnosti aktivní látky pro organismus, např. famciclovir je derivát uzpůsobený pro orální užití. Všechny tyto sloučeniny jsou z hlediska své aktivity velmi selektivní a mají nízkou toxicitu. Aciclovir byl také testován z hlediska vlivu na riziko výskytu HIV. Z hlediska rizika přenosu nebyl objeven prokazatelný vliv, nicméně lze pomocí této látky zpomalit celkový vývoj této nemoci^{25,26}.



XXXX

XXXXI

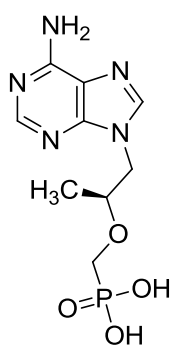
XXXXII

XXXXIII

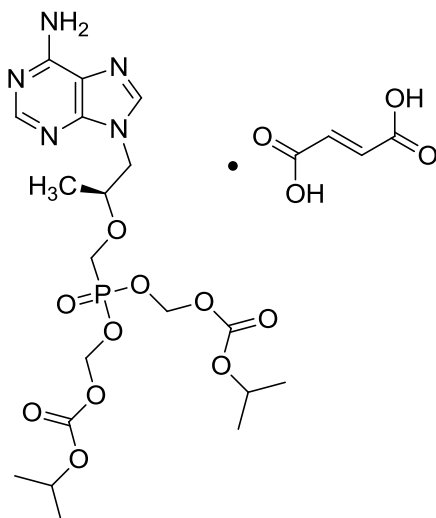
(Schéma 19)

3.2.2.4 Tenofovir, adefovir

Jedním z nejdůležitějších purinových derivátů s účinkem na lidský organismus je tenofovir (XXXXIV), známý pod komerčním názvem Viread. Je dodáván ve formě disoproxil-fumarátu (XXXXV) a je významnou látkou v oblasti vývoje léčiv proti virům snižujícím schopnost obranyschopnosti organismu. V těle funguje jako terminátor řetězce DNA, kdy nejprve dochází k jeho fosforylaci a následné inhibici reverzní transkriptázy, která rozvíjí virus HIV, příp. také virus hepatitidy B. Bylo prokázáno, že tenofovir je aktivní proti virům HIV-1 a HIV-2. Jeho pozitivní účinek byl také potvrzen při výzkumu potlačení výskytu viru SIV, což je virus podobný lidskému HIV, vyskytující se u primátů. Tento virus je považován za původní virus, ze kterého se později vyvinul HIV. Tenofovir se spolu se svým strukturním analogem adefovirem (XXXXVI) (Schéma 20) také využívá pro léčbu infekcí virem hepatitidy B. Některé typy HBV mohou být rezistentní vůči adefoviru, v těchto případech se tedy využívá právě tenofoviru. Adefovir je obchodními názvy označován jako Hepsera nebo Preveon a používá se výhradně pro léčbu HBV^{27,28,29}.

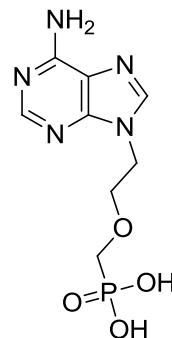


XXXXIV



XXXXV

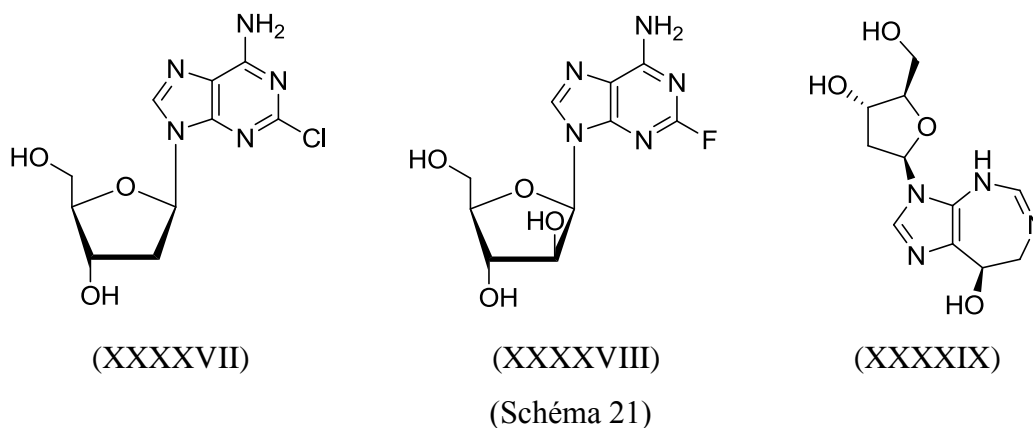
(Schéma 20)



XXXXVI

3.2.2.5 Cladribin, fludarabin, pentostatin

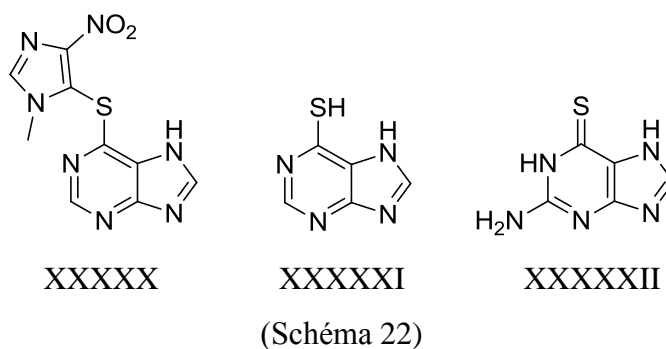
Některé purinové deriváty, jako např. cladribin (XXXXVII) fludarabin (XXXXVIII) nebo pentostatin (XXXXIX) (který se také řadí mezi látky odvozené od purinu, i když má poněkud pozměněný skelet) (Schéma 21) jsou využívány pro léčbu chorob způsobovaných nadměrnou produkcí lymfocytů. Jedná se o látky zaměřující se proti tvorbě hematologických malignitů, tj. nádorů krve, mezi které patří např. leukémie. Obě dvě jsou imunní vůči deaminaci, kterou u adenosinu zajišťuje adenosin deaminasa (ADA), a tím pádem inhibují syntézu DNA. Cladribin i pentostatin jsou konkrétně využívány u pacientů trpících vlasatobuněčnou leukémií (hairy cell leukemia), což je zvláštní forma leukémie způsobovaná poruchou B-lymfocytů. Díky tomu, že jsou látky velmi podobné běžným nukleosidům, není průběh léčby tak drastický, jako při použití klasické chemoterapie. Cladribin je navíc účinný při léčbě roztroušené sklerózy, protože snižuje recidivu této nemoci. Fludarabin je velmi úspěšný při léčbě chronické lymfatické leukemie, využívá se v kombinaci s jinými podobnými účinnými látkami pro zvýšení biologického účinku^{30,31,32,33}.



3.2.2.6 Další deriváty

Azathioprin, merkaptopurin, thioguanin

Azathioprin (XXXXX) je derivátem 6-merkaptopurinu (XXXXXI), thioguanin (6-thioguanin) (XXXXXII) patří do skupiny thiopurinů (Schéma 22). V organismu slouží tyto látky jako inhibitory metabolismu purinů, díky své funkci se začlenit do DNA. Z toho důvodu se používají jako imunosupresiva, tzn. jako léčivé látky při autoimunitních onemocněních. Příkladem může být Crohnova choroba, která postihuje trávicí trakt, ale může mít dopad i na jiné orgány (postižení očí a kůže)^{34,35}.



3.3 Obecný popis syntézy na pevné fázi

Historicky první použití syntézy na pevné fázi bylo popsáno Robertem B. Merrifieldem v roce 1963. Merrifield využil polystyrenovou pryskyřici, která byla částečně chlormethylována. Substitucí těchto funkčních skupin dokázal připravit tetrapeptidový řetězec a učinil tak revoluční objev v oblasti organické syntézy. Popsal

také metody protekce a deprotece aminoskupin na řetězci aminokyselin a poukázal na to, že syntéza na pevné fázi má v budoucnu vysoké uplatnění v oblasti přípravy široké škály látek s možnou biologickou aktivitou³⁶.

Postup syntézy na pevné fázi je rychle se rozvíjející odvětví v oblasti organické syntézy. Kromě syntézy peptidů a oleonukleotidů se využívá k syntéze tzv. malých molekul, které lze efektivně ukotvit na nosiči s vhodnými funkčními skupinami. Nosič je zpravidla tvořen polymerní strukturou a linkerem, který je zvolen tak, aby vazba mezi ním a imobilizovanou strukturou byla stabilní při běžných syntetických reakcích, ale zároveň musí být snadno štěpitelná v úzkém spektru podmínek (např. vlivu pH). To znamená, že syntéza na pevné fázi může v určitých případech poskytovat jen omezené množství organických látek, neboť musí být splněny následující podmínky : musí být vhodně zvolen pevný nosič a linker tak, aby bylo možné látku imobilizovat a poté snadnou metodou odštěpit; daná syntetická cesta musí být uzpůsobena tak, aby některé reakční kroky nevedly k narušení systému nosič-linker-výchozí látky.

Ve srovnání s roztokovou syntézou má syntéza na pevné fázi řadu výhod i nevýhod. Hlavními výhodami jsou především rychlá izolace připravených látek, nízká časová náročnost a jednoduchost přípravy širokého spektra rozličných struktur v poměrně krátkém čase. Mezi nevýhody patří příprava pouze malého množství finálního produktu, omezení v podobě vhodných nosičů a linkerů a v neposlední řadě náročnější optimalizace reakčních podmínek.

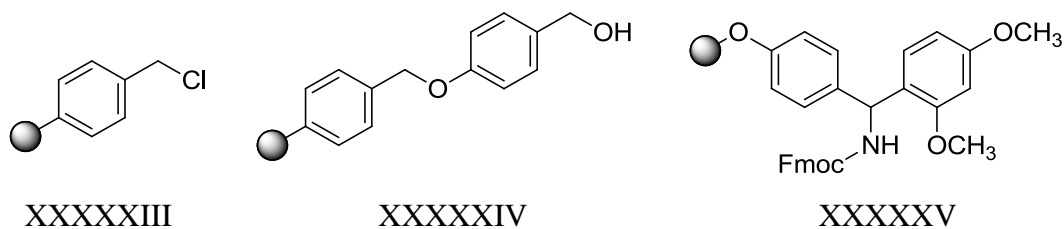
3.3.1 Pevné nosiče

Pevný nosič je porézní materiál, který má polymerní strukturu tvořenou chemicky nereaktivním skeletem a vhodnými funkcemi, na které lze navázat linker a poté i výchozí látku pro danou syntézu. Jako pevné nosiče se používají komerčně dostupné pryskyřice, které obsahují konkrétní funkční skupiny, např. amidovou, karboxylovou nebo hydroxylovou skupinu. Tyto funkce pak určují i následné využití pro daný typ pryskyřice.

Kromě vhodných funkčních skupin a inertní struktury musí mít pryskyřice také vlastnost bobtnat v určitých rozpouštědlech, aby bylo možné co nejefektivněji využít všechna aktivní místa ve struktuře pevného nosiče. Pryskyřice tím pádem zvětší svůj

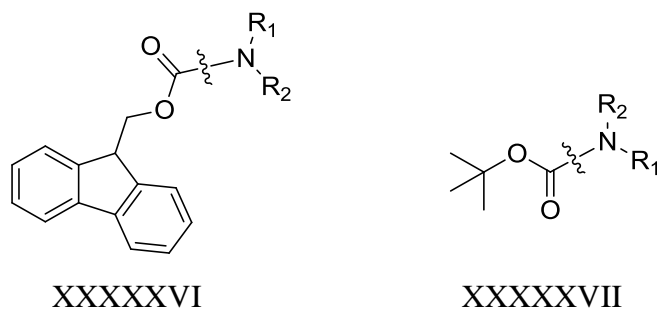
objem a umožní tak molekulám snadnější přístup k funkčním skupinám po celém svém povrchu.

V současné době je k dispozici široká škála komerčně dostupných druhů pryskyřic. Mezi nejpoužívanější patří již zmíněná Merrifieldova pryskyřice (XXXXXIII), Wangova pryskyřice (XXXXXIV), Rinkova amidová pryskyřice (XXXXXV) atd. (Schéma 23).



(Schéma 23)

U výše zmíněných pryskyřic není nutné před samotnou syntézou navázat vhodný linker, neboť jsou již dodávány s vhodnými funkčními skupinami pro substituci. V případě Rinkovy pryskyřice je potřeba nejprve odstranit chránící Fmoc skupinu. Fmoc skupina - fluorenylmethoxykarbonyl (XXXXXVI) společně s Boc skupinou terc.-butyloxykarbonyl (XXXXXVIII) (Schéma 24) slouží k protekci aminoskupin a hojně se využívají převážně při syntézách peptidů i malých molekul.



(Schéma 24)

3.3.2 Linkery

S rozvojem syntézy na pevné fázi byla vyvinuta také řada linkerů umožňujících imobilizaci široké škály látek. Linker je molekula tvořící spojnici mezi polymerní strukturou pryskyřice a zakotvenou výchozí látkou. Vazba s pryskyřicí je zpravidla

obtížně štěpitelná a tudíž stabilní, naopak vazba s imobilizovanou molekulou bývá lehce štěpitelná např. v kyselém nebo zásaditém prostředí. To umožňuje rychlou a efektivní izolaci produktů připravených na pevné fázi.

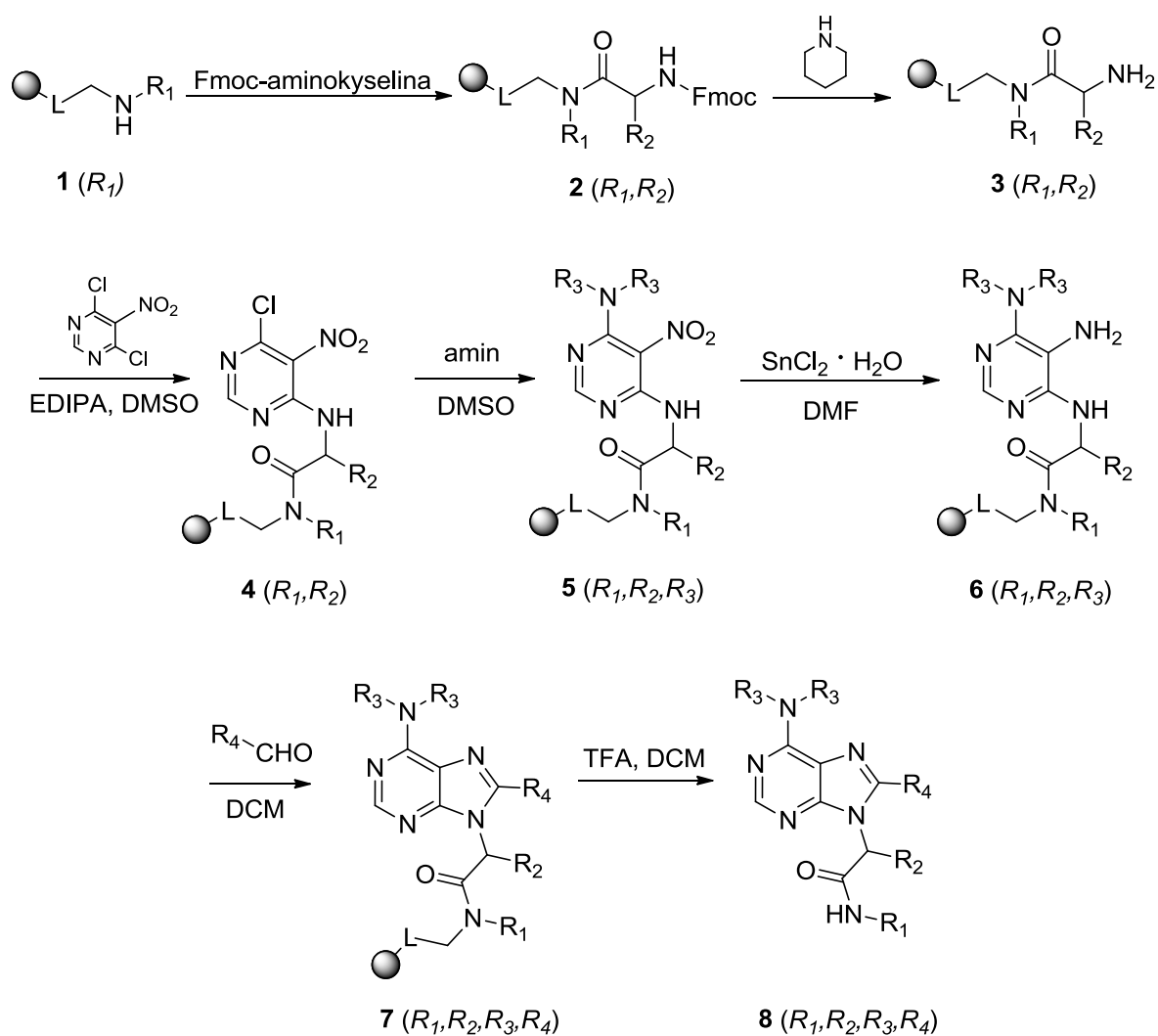
Cílovou látku je na linker možné upevnit přes různé funkční skupiny. V případě aminokyselin se využívá imobilizace jak přes amino skupinu, tak přes karboxylovou funkci. Pokud je jedna z těchto skupin vázána na linker, musí být druhá skupina vhodně ochráněna, aby bylo zakotvení aminokyseliny jednoznačné.

V organické syntéze se používají převážně takové typy linkerů, které jsou labilní v kyselém prostředí. Pro štěpení látek z těchto linkerů se využívá převážně kyselina trifluoroctová, méně často pak fluorovodíková. Obě kyseliny jsou snadno odstranitelné vzhledem k nízkým teplotám varu.

Při jednotlivých reakčních krocích je nutné používat takové prostředí, které nenarušuje stabilitu systému pryskyřice-linker-imobilizovaná molekula. Proto se např. při použití kyselých labilních linkerů pracuje většinou v bazickém nebo neutrálním prostředí. Pokud je kyselé prostředí pro některou reakci vyžadováno, je nutné použít bazicky labilní linker. Volba vhodného linkeru je tedy klíčová pro správnou a efektivní syntézu na pevné fázi.³⁷

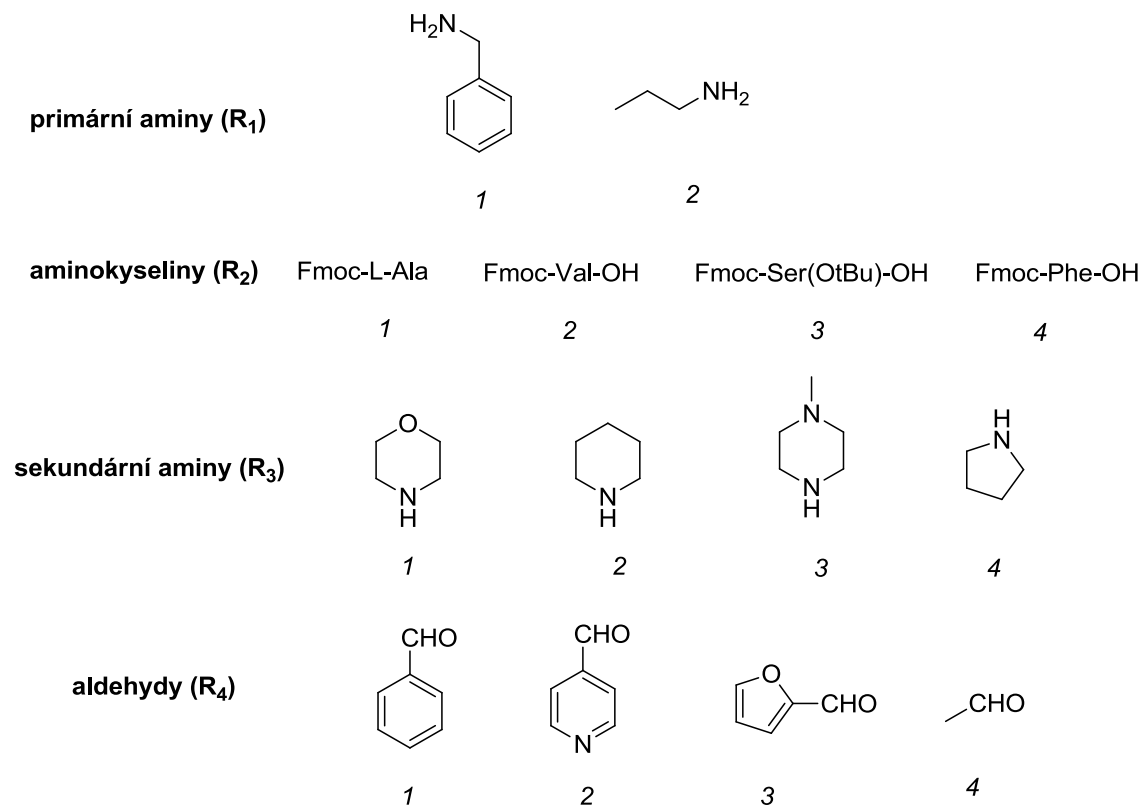
4. Výsledky a diskuze

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vyvinout jednoduchou metodiku přípravy derivátů purinu nesoucích v poloze N⁹ motiv přírodní α -aminokyseliny. Jako výchozí látky pro ověření dané syntetické cesty sloužily amino sloučeniny, vhodně chráněné α -aminokyseliny a aldehydy. Navržené obecné schéma přípravy je uvedeno ve Schématu 25.



(Schéma 25)

Obr. 1 : Seznam použitých výchozích látek



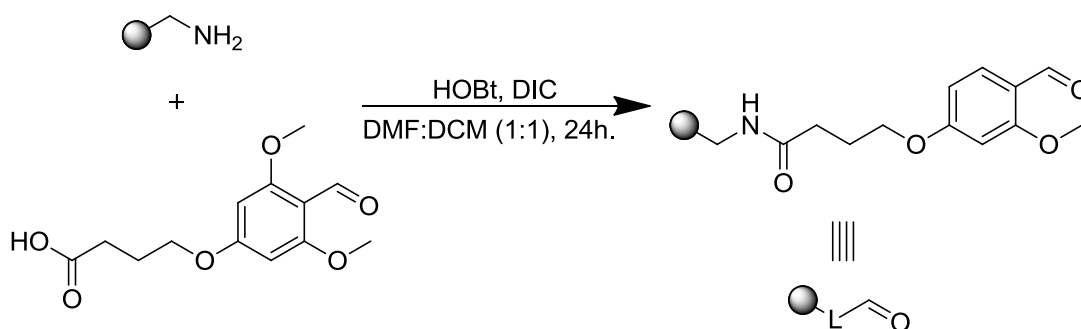
4.1 Popis zvolené syntetické cesty

K samotné syntéze byla zvolena jako pevný nosič aminomethylová pryskyřice, na kterou byl ukotven BAL linker s imobilizovaným primárním aminem. Na tuto strukturu pak byla navázána α -aminokyselina ve formě amidu. Tento systém pryskyřice-linker-výchozí látka byl poté podroben arylaci 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem. Následná aminace se sekundárním aminem sloužila k substituci zbývajících chloru na pyrimidinovém kruhu. Poté byla provedena redukce nitro skupiny na amino skupinu. Díky tomu bylo možné pomocí zvoleného aldehydu provést cyklizaci imidazolového kruhu a tedy uzavření purinového skeletu. Díky amino skupině na výchozí aminokyselině se struktura imobilizovaná na pryskyřici stala ligandem na purinovém jádře v poloze N⁹.

4.1.1 Příprava výchozí imobilizované aminokyseliny

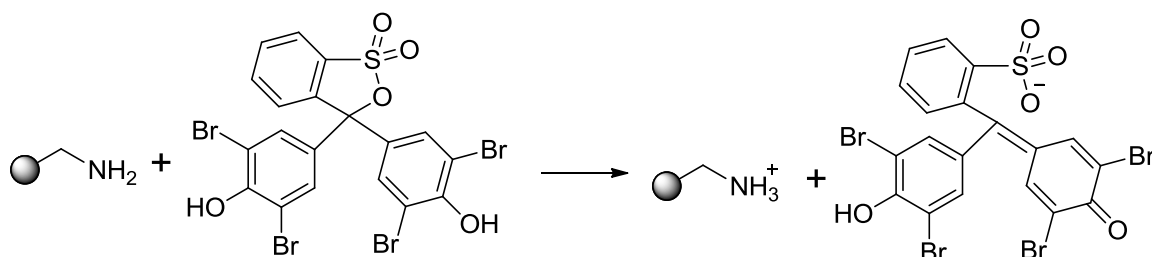
4.1.1.1 Ukotvení BAL linkeru

Prvním krokem syntézy bylo ukotvení BAL linkeru s aminomethylovou pryskyřicí. Cílový systém byl vytvořen reakcí pryskyřice s 4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanovou, HOBt a DIC (Schéma 26). Tato reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě.



(Schéma 26)

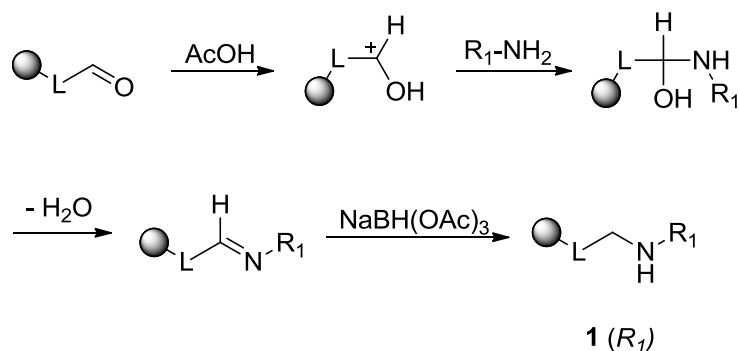
Kvantitativní průběh reakce byl ověřen testem s bromfenolovou modří, která v přítomnosti volné amino skupiny otvírá jeden ze svých kruhů (Schéma 27). Tato reakce je charakteristická změnou zbarvení pryskyřice. Modrání pryskyřice indikuje přítomnost volné amino skupiny v případě nekvantitativního navázání BAL linkeru. V našem případě bylo při prvním ukotvení linkeru zbarvení pryskyřice žluté, při druhém pak zelené. Oba tyto výsledky byly dostačující a pryskyřice tak mohla být použita pro další reakce.



(Schéma 27)

4.1.1.2 Reduktivní aminace

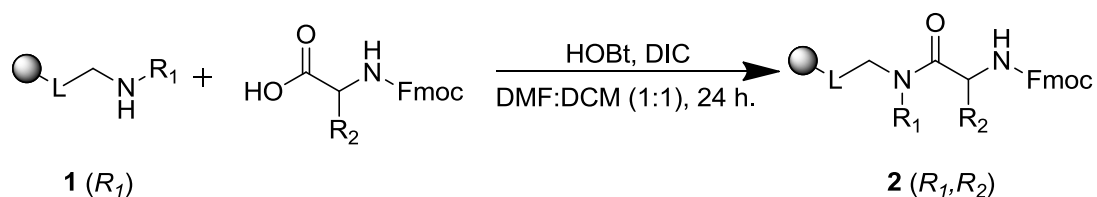
Jakmile byla připravena výchozí pryskyřice s ukotveným BAL linkerem, mohla být provedena tzv. reductivní aminace. Cílem této reakce bylo imobilizovat na linker primární amin, který poté umožnil navázat danou α -aminokyselinu přes amidovou vazbu. První fází reakce byla samotná imobilizace aminu, který byl rozpuštěn v 10% kyselině octové v bezvodém DMF. Po 24 hodinách byl k roztoku přidán triacetoxyborohydrid sodný v 5% kyselině octové v bezvodém DMF (Schéma 28). Pro odvod vznikajícího vodíku byla pod píšť stříkačky umístěna jehla. Pryskyřice pak byla po reakci ještě 10 minut protřepána s 20% piperidinem v DMF. Loading pryskyřice po reductivní aminaci byl určen kontrolní reakcí s Fmoc-OSu v DCM. Analýzou s vnějším standardem Fmoc-alaninu a následnou integrací a srovnáním ploch píků standardu a analyzovaných látek v LC-MS systému byl stanoven skutečný loading použité pryskyřice. Dosažené hodnoty byly pro **1** (1) 0,250 mmol/g, pro **1** (2) pak 0,252 mmol/g.



(Schéma 28)

4.1.1.3 Imobilizace aminokyseliny

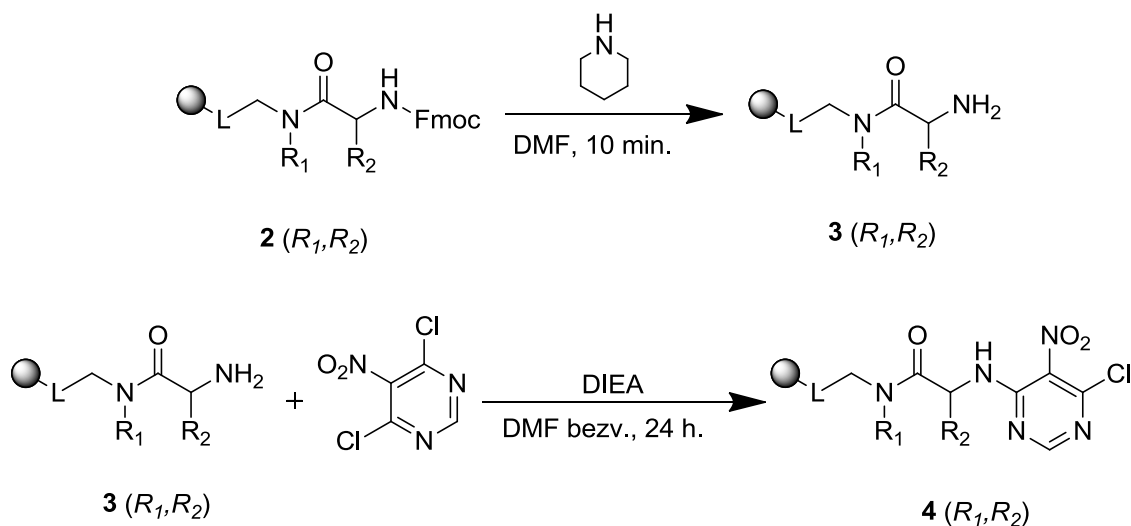
Samotné navázání kyseliny na amin bylo prováděno v podobných podmínkách jako ukotvení BAL linkeru na pryskyřici s přidavkem konkrétní aminokyseliny. Amino skupina na příslušné aminokyselině byla chráněna Fmoc skupinou, a reakce tedy probíhala na karboxylové skupině tvorbou amidu s aminem navázaným při reductivní aminaci (Schéma 29). Kvantitativní průběh reakce byl opět ověřen kontrolní reakcí s Fmoc-OSu, nebylo ale již nutné počítat loading. Touto metodou byly připraveny intermediáty **2** (1,1), **2** (1,2), **2** (1,3) a **2** (2,4).



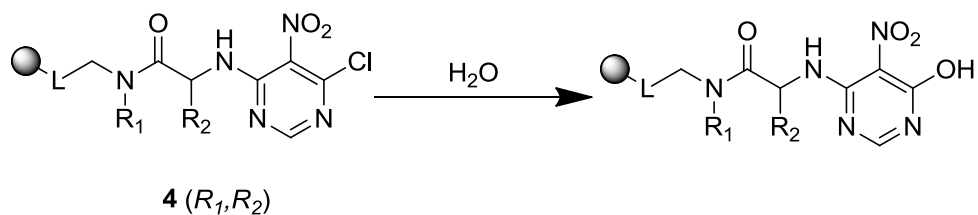
(Schéma 29)

4.1.2 Arylace s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem

Před samotným navázáním pyrimidinového derivátu bylo nejprve nutné odstranit Fmoc protektivní skupinu z amino skupiny dané kyseliny. To bylo zajištěno reakcí s 50% piperidinem v DMF po dobu 10 minut. Po této reakci byla pryskyřice třepána s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem v bezvodém DMF a bazickém prostředí (Schéma 30). Bezvodé rozpouštědlo bylo pro tuto reakci zvoleno proto, že po substituci jednoho chloru na pyrimidinovém skeletu docházelo k vedlejší reakci, a to hydrolyze druhého chloru na hydroxylovou skupinu (Schéma 31). Později pak z důvodu problémů s hydrolyzou nebyl tento krok analyzován vůbec a rovnou byla nasazena další reakce. Byly připraveny deriváty **4 (1,1)**, **4 (1,2)**, **4 (1,3)** a **4 (2,4)**.



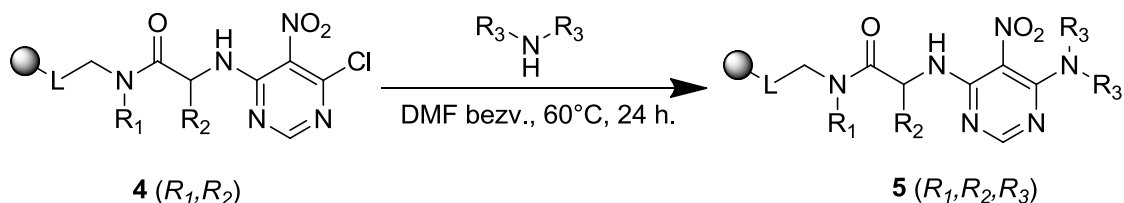
(Schéma 30)



(Schéma 31)

4.1.3 Aminace na pyrimidinový kruh

Substituce zbývajícího chloru sekundárním aminem byla prováděna ihned po skončení předchozí reakce a taktéž v bezvodém rozpouštědle, aby bylo zabráněno hydrolyze příslušného intermediátu. Průmysl byla třepána s 10% roztokem příslušného aminu v bezvodém DMF (Schéma 32). Úplné odstranění hydrolyzovaného produktu bylo dosaženo zvýšením teploty reakce na 60°C. Bylo totiž zjištěno, že hydrolyza probíhá převážně až během přípravy vzorku k analýze. Nebyla-li aminace kvantitativní, zbylý monochlor derivát poskytoval hydrolyzou hydroxy derivát. Z toho důvodu byla pro reakci použita vyšší teplota. Při 60°C došlo ke kvantitativní reakci a vedlejší hydroxy derivát tak nebyl v analyzovaném vzorku přítomen. Aminací byly postupně připraveny meziproducty **5** (1,1,2), **5** (1,2,1), **5** (1,3,4) a **5** (2,4,3).

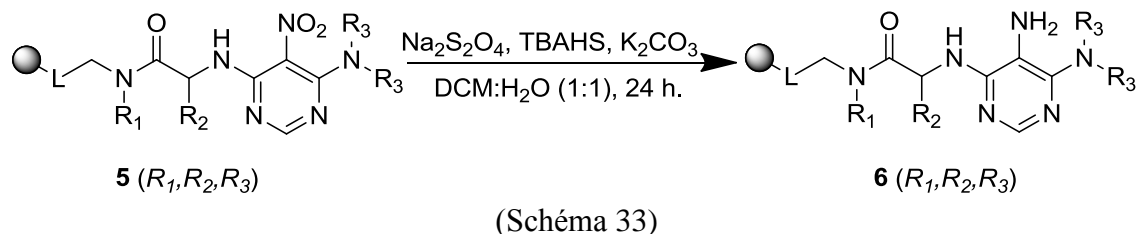


(Schéma 32)

4.1.4 Redukce nitro skupiny na amino skupinu

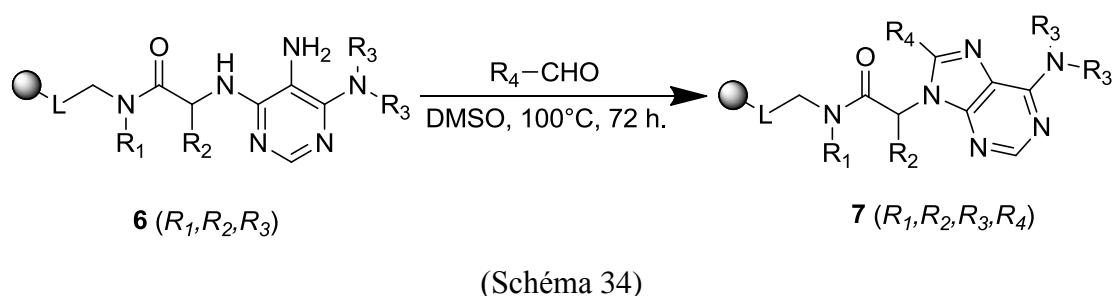
Aby mohla být provedena cyklizace imidazolového kruhu a tedy dokončení purinového jádra, musela být NO_2 skupina na pyrimidinu zredukována na NH_2 skupinu (Schéma 33). K redukci byl používán dithioničitan sodný. Reakce probíhala ve dvoufázovém prostředí $\text{DCM}:\text{H}_2\text{O}$. Původní variantou bylo použití chloridu cínatého jako redukčního činidla místo dithioničitanu, ale tato metoda nebyla kvantitativní a navíc zbytky cínatých solí kontaminovaly produkt reakce a znesnadňovaly tak finální

purifikaci. Navíc vzhledem k tomu, že redukce za použití dithioničitanu byla velmi efektivní, byla použita pro všechny připravené látky. Redukcí předchozích látek byly připraveny látky **6** (1,1,2), **6** (1,2,1), **6** (1,3,4) a **6** (2,4,3).



4.1.5 Finální cyklizace

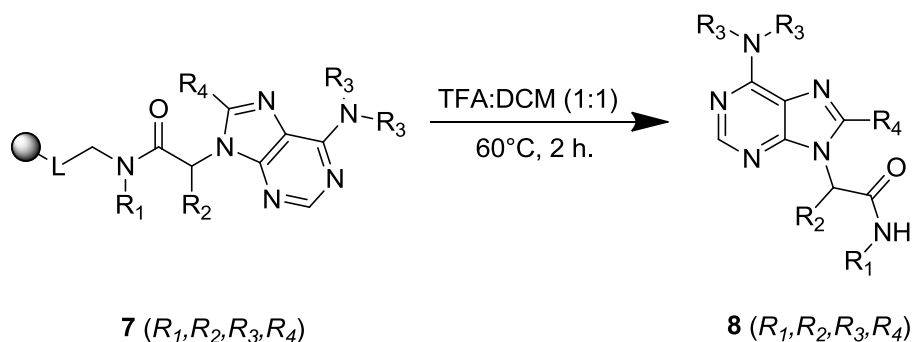
Po redukci následoval poslední krok celé syntézy, a to cyklizace imidazolového kruhu působením aldehydu (Schéma 34). Tato reakce probíhala v prostředí 0,2 M roztoku příslušného aldehydu v DMSO. Pro tuto reakci byla nejprve testována teplota 60°C, ale po skončení reakce bylo ve směsi zjištěno velké množství výchozí látky a jen malé množství produktu. Nakonec byla optimální teplota stanovena na 100°C a reakční doba na 72 hodin. Touto metodou byly připraveny produkty **7** (1,1,2,1), **7** (1,2,1,2), **7** (1,3,4,3) a **7** (2,4,3,4).



4.2 Odštěpení a purifikace finálních produktů

Pro odštěpení konečných struktur z pryskyřice byla nejprve navržena podobná metoda jako při štěpení jednotlivých meziproduktů pro analýzu (Schéma 35), tj. celé množství pryskyřice bylo třepáno 1 hodinu v 50% TFA v DCM a poté ještě promyto tímto roztokem pro kvantitativní výtěžek. Ukázalo se ale, že i přes delší dobu štěpení nejsou výtěžky dostatečně vysoké. Proto byly další látky štěpeny 2 hodiny ve stejné

směsi, ale se záhřevem na 60°C. Směs po štěpení byla později vysušena proudem dusíku a odparek byl ponechán v reakční nádobě, připraven k přečištění. Jako finální produkty byly připraveny látky **8** (1,1,2,1), **8** (1,2,1,2), **8** (1,3,4,3) a **8** (2,4,3,4).

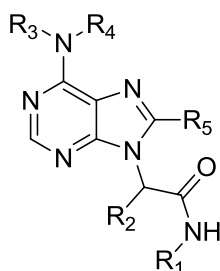


(Schéma 35)

Produkty po odštěpení byly rozpuštěny v AcCN a následně přečištěny pomocí semipreparativního HPLC systému na základě specifických absorbancí v UV-VIS oblasti.

4.3 Přehled připravených látek

V rámci práce byly v preparativním množství připraveny čtyři cílové deriváty purinu s pestrou škálou substituentů v polohách 6, 8 a 9. V poloze 9 byl pak přítomen prvek aminokyseliny ve formě amidu, který byl klíčovým substituentem pro celou syntézu. Struktura produktů **8** (1,1,2,1), **8** (1,2,1,2) a **8** (2,4,3,4) byla potvrzena pomocí NMR.



kód látky	R ₁	R ₂	R ₃ -N-R ₃	R ₄	surová čistota
8 (1,1,2,1)					81,3 %
8 (1,2,1,2)					69,6 %
8 (1,3,4,3)					81,2 %
8 (2,4,3,4)					71,7 %

5. Experimentální část

Pro přípravu jednotlivých látek na pevné fázi byly využity plastové stříkačky opatřené fritou z polypropylenu, která zajišťovala snadnou prostupnost rozpouštědel a reakčních roztoků k intermediátům zakotvených na nosiči, a zároveň bránila vymytí pryskyřice ven ze stříkačky. Promývání a samotné reakce byly prováděny na laboratorním shakeru. Při užití vyšších reakčních teplot pak byla k reakci použita skleněná vialka umístěná v olejové lázni. Míchání bylo zajištěno pomocí magnetického míchadla.

5.1 Přístroje a metody

Acquility UHPLC-MS (Waters)

- hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem
- mobilní fáze : 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN; lineární gradient z 20% na 80% AcCN po dobu 2,5 minut, poté ekvilibrace kolony 20% AcCN po dobu 1 minuty
- průtok 0,6 ml/min
- X Select kolona (HSS T3; 2,5 mikronů)
- další parametry: odpařovací teplota 400°C, kapilární teplota 200°C

Lyofilizátor SCANVAC

- k odstranění zbytků rozpouštědel (AcCN, H₂O, DMSO) z výsledného vzorku

Semipreparativní HPLC Breeze

- separace na základě specifických absorbcí v UV-VIS oblasti
- mobilní fáze: 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN
- průtok 20 ml/min
- YMC kolona (YMC Pack ODS-A, 5μm, 100x20 mm)

NMR JEOL - 500 MHz

- měření spekter v d₆ DMSO (při 23°C)
- chemický posun v ppm, interakční konstanty v Hz

5.2 Štěpení vzorku z pevné fáze a následná analýza

5.2.1 Štěpení vzorku a příprava k analýze

Odštěpení vzorku z pryskyřice bylo nutné pro podrobnější analýzu struktur navázaných na nosič. Jako štěpící směs byl používán roztok kyseliny trifluoroctové v DCM v poměru 1:1. Při běžné analýze bylo ke štěpení odebráno cca. 5 mg vzorku, při kvantifikaci pak cca. 10 mg vzorku (přesná hmotnost byla zapsána pro pozdější výpočet loadingu). Tato pryskyřice byla třepána s 1 ml štěpící směsí na shakeru po dobu 30 minut. V případě aminokyseliny serinu, kde byla hydroxylová funkce chráněna terebutylovou skupinou, probíhalo štěpení cca. 2 hodiny pro odchránění OH skupiny na postranním řetězci kyseliny. Po štěpení byla směs s pryskyřicí umístěna pod proud dusíku, čímž došlo k odpaření těkavé složky. K odparku byl poté přidán cca. 1 ml směsi rozpouštědel methanol:voda (1:1), v případě kvantifikace pak přesně 1 ml methanolu pro HPLC. Tento roztok byl poté přefiltrován do vialky a umístěn do autosampleru v LC-MS systému k analýze.

Pro látky, které nemají dostatečnou absorpci v UV oblasti, byla před analýzou provedena derivatizace navázáním Fmoc skupiny, která v dané oblasti absorbuje záření. Příprava vzorku byla prováděna s malým množstvím pryskyřice reakcí s Fmoc-OSu (0,5 mmol; 160 mg) a DIEA (0,5 mmol; 83 μ l) v 1 ml DCM. Reakční směs byla třepána na shakeru po dobu 30 minut a poté promyta 3x DCM a 3x MeOH. Následně bylo provedeno štěpení roztokem TFA a příprava vzorku k analýze.

5.2.2 Obecný postup pro stanovení loadingu při kvantifikaci

Pro určení loadingu pryskyřice byla použita metoda vnějšího standardu. Nejprve byl analyzován standard Fmoc- β -alaninu o přesné koncentraci. Poté byly analyzovány zkoumané vzorky odštěpené z přesného množství pryskyřice, které byly rozpuštěny přesně v 1 ml MeOH. Pro každou látku byly použity 2 vzorky. Z integrace ploch píků standardu a vzorků na LC-UV při 300 nm bylo stanoveno látkové množství dané látky, které bylo poté přepočítáno na 1 g použité pryskyřice.

$$n_{vz.} = \frac{S_{vz.}}{S_{stand.}} * \frac{c_{stand.}}{M_{stand.}}$$

$$L = \frac{n_{vz.}}{m_{prysk.}}$$

($n_{vz.}$ = látkové množství vzorku [mol]; $S_{vz.}$ = plocha píku vzorku; $S_{stand.}$ = plocha píku standardu; $c_{stand.}$ = hmotnostní koncentrace standardu [mg/ml]; $M_{stand.}$ = molární hmotnost standardu [g/mol]; L = loading pryskyřice [mmol/g]; $m_{prysk.}$ = navážka pro vzorek pryskyřice [mg])

5.3 Syntéza na aminomethylové pryskyřici

5.3.1 Ukotvení BAL linkeru

Do stříkačky s polypropylenovou fritou byl navážen 1 g aminomethylové pryskyřice (původní loading 0,98 mmol/g). Pryskyřice byla promyta 3x DCM. Poté byl do stříkačky přidán roztok 10% TEA v DMF (10 ml). Reakční směs byla třepána 10 minut a poté promyta 3x DMF. Následně byl přidán roztok 4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butanové kyseliny (2 mmol; 476 mg), HOBt (2 mmol; 306 mg) a DIC (3,6 mmol; 557 μ l) v DMF:DCM (1:1; 10 ml). Třepáno přes noc, poté promyto 3x DMF, 3x DCM.

Analýza: Roztok bromfenolové modře v DCM (0,5 ml) byl přidán k cca. 3 mg pryskyřice. Po protřepání bylo sledováno zbarvení pryskyřice. Modrý výsledek znamenal nedostatečnou kvantifikaci, výsledek byl žlutozelený nebo zelený, takže imobilizace linkeru byla dostatečná.

5.3.2 Reduktivní aminace

1g pryskyřice s navázaným BAL linkerem byl promyt 3x bezvodým THF a 3x bezvodým DMF. Poté byl do stříkačky přidán roztok příslušného aminu - benzylaminu (4 mmol; 437 μ l) nebo propylaminu (4 mmol; 329 μ l) v 10% kyselině octové v bezvodém DMF (10 ml). Reakční směs byla třepána přes noc, poté nebyla pryskyřice promyta, ale přímo do stříkačky byl přidán roztok triacetoxyborohydridu sodného (1,25

mmol; 317 mg) v 5% kyselině octové v bezvodém DMF (5 ml). Stříkačka byla zafixována do svislé polohy a pod píst byla umístěna zahnutá jehla pro odvod vodíku. Po 1 hodině třepání byla do stříkačky přidána další dávka triacetoxyborohydridu (1,25 mmol; 317 mg) a byla nasypána přímo do reakční směsi. Po další hodině byla přidána poslední dávka triacetoxyborohydridu (1,25 mmol; 317 mg) a reakce byla ponechána 2 hodiny k doreagování. Po uplynulé době byla pryskyřice promyta 3x DMF a následně třepána 10 minut v roztoku 20% piperidinu v DMF (10 ml). Poté byla promyta 3x DMF, 3x DCM, 3x MeOH a vysušena pod proudem dusíku.

Analýza: 30 mg pryskyřice bylo reagováno s roztokem Fmoc-OSu (0,5 mmol; 169 mg) a DIEA (0,5 mmol; 87 μ l) v DCM (1 ml). Reakce probíhala 30 minut, poté byla pryskyřice promyta 3x DCM, 3x MeOH a vysušena. Z vysušené pryskyřice bylo odebráno 2x 10 mg pro analýzu (přesná hmotnost byla zaznamenána). Tyto dva vzorky byly štěpeny po dobu 30 minut v TFA/DCM (1:1; 1 ml). Reakční směs byla ponechána k odpaření pod proudem dusíku. Odparek byl poté rozpuštěn přesně v 1 ml MeOH, přefiltrován a následně analyzován se standardem Fmoc- β -alaninu. Na základě porovnání ploch píků se standardem o známé koncentraci byl stanoven loading používané pryskyřice. V případě benzylaminu byl loading 0,250 mmol/g, ve druhé pak 0,221 mmol/g, u propylaminu měl hodnotu 0,183 mmol/g. Na základě těchto hodnot bylo v dalších reakcích používáno 400 mg pryskyřice.

1 (1): čistota 98,7 %; UHPLC-MS m/z = 330 [M+H]⁺

1 (2): čistota 98,7 %; UHPLC-MS m/z = 282 [M+H]⁺

5.3.3 Imobilizace aminokyseliny

Z pryskyřice po reduktivní aminaci bylo odebráno 400 mg. Toto množství bylo následně reagováno s příslušnou aminokyselinou (použité aminokyseliny měly amino skupinu ochráněnou Fmoc protektivní skupinou, serin měl navíc ochráněnou i hydroxylovou skupinu na vedlejším řetězci pomocí tercbutylu) - Fmoc-Phe-OH (1,6 mmol; 620 mg), Fmoc-Val-OH (1,6 mmol; 543 mg), Fmoc-Ser(tBu)-OH (1,6 mmol; 614 mg). Tyto aminokyseliny byly k pryskyřici přidány spolu s HOBt (1,2 mmol; 160 mg) a DIC (1,2 mmol; 170 μ l) ve směsi DMF/DCM (1:1; 4 ml). Reakce běžela přes noc, poté byla pryskyřice promyta 3x DMF, 3x DCM a 3x MeOH.

Analýza: 5 mg pryskyřice reagováno s roztokem Fmoc-OSu (viz 5.3.2 - Analýza). Nebylo nutné již zaznamenávat přesnou navážku, tato kontrola sloužila pouze k potvrzení kvantitativního průběhu reakce. Po reakci a promytí pryskyřice byl vzorek štěpen v TFA/DCM (1:1, 1 ml) po dobu 30 minut. V případě reakce se serinem, který měl hydroxy skupinu chráněnou tercbutylem, bylo štěpení prováděno 2 hodiny, aby byla tato skupina kvantitativně odchráněna a nedocházelo tak ke zkreslení analýzy přítomností dvou signálů pro produkt reakce. Po štěpení byla směs vysušena dusíkem a odparek rozpuštěn v roztoku MeOH/H₂O (1:1, 1 ml), přefiltrován a analyzován v LC-MS systému.

2 (1,1): čistota 83,7 %; UHPLC-MS m/z = 401 [M+H]⁺

2 (1,2): čistota 71,3 %; UHPLC-MS m/z = 429 [M+H]⁺

2 (1,3): čistota 93,4 %; UHPLC-MS m/z = 417 [M+H]⁺

2 (2,4): čistota 90,6 %; UHPLC-MS m/z = 429 [M+H]⁺

5.3.4 Arylace 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem

400 mg pryskyřice s odpovídající imobilizovanou aminokyselinou bylo nejprve reagováno 10 minut s 50% piperidinem v DMF (4 ml). Díky tomu došlo k odstranění Fmoc chránící skupiny na struktuře aminokyseliny. Po této reakci byla směs promyta 3x DMF a 3x DCM. Před samotnou arylací došlo ještě k promytí 5x bezvodým DMF pro odstranění vody. Pryskyřice pak byla reagována s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem (10 mmol; 1660 mg) a DIEA (4 mmol; 660 μ l) v bezvodém DMF (4 ml). Reakce probíhala na třepačce přes noc, poté byla reakční směs promyta 3x bezvodým DMF a 3x bezvodým DCM.

Analýza: Neanalyzováno z důvodu rizika vznikajícího hydrolyzovaného analogu v průběhu štěpení a analýzy.

5.3.5 Aminace sekundárním aminem

Celkové množství pryskyřice (400 mg) z předchozího kroku bylo podrobeno reakci s roztokem příslušného sekundárního aminu (0,4 ml) - piperidinu, N-methylpiperazinu, pyrrolidinu nebo morfolinu - v bezvodém DMF (4 ml). Reakce běžela přes noc na třepačce, poté byla reakční směs promyta 3x DMF a 3x DCM.

Analýza: 5 mg pryskyřice bylo štěpeno v roztoku TFA/DCM (1:1, 1 ml) po dobu 30 minut (pro serin byla doba štěpení prodloužena na 2 hod.). Po odpaření štěpící směsi byl odparek rozpuštěn v MeOH/H₂O (1:1, 1 ml) a po filtraci analyzován v LC-MS systému.

5 (1,1,2): čistota 58,0 %; UHPLC-MS m/z = 385 [M+H]⁺

5 (1,2,1): čistota 73,0 %; UHPLC-MS m/z = 415 [M+H]⁺

5 (1,3,4): čistota 63,4 %; UHPLC-MS m/z = 443 [M+H]⁺

5 (2,4,3): čistota 55,0 %; UHPLC-MS m/z = 428 [M+H]⁺

5.3.6 Redukce nitro skupiny

400 mg pryskyřice po aminaci bylo reagováno s roztokem Na₂S₂O₄ (4,6 mmol; 800 mg), K₂CO₃ (5,8 mmol; 800 mg) a TBAHS (0,4 mmol; 136 mg) v dvoufázovém systému DCM/H₂O (1:1; 8 ml). Reakce běžela několik hodin, pro kvantitativní průběh byla ale ponechána přes noc na třepačce. Druhý den byla pryskyřice promyta 3x DCM/H₂O (1:1), 3x DMF, 3x MeOH a 3x DCM.

Analýza: viz 5.3.5 - Analýza.

6 (1,1,2): čistota 81,2 %; UHPLC-MS m/z = 355 [M+H]⁺

6 (1,2,1): čistota 91,4 %; UHPLC-MS m/z = 385 [M+H]⁺

6 (1,3,4): neanalyzován.

6 (2,4,3): čistota 68,7 %; UHPLC-MS m/z = 398 [M+H]⁺

5.3.7 Cyklizace s aldehydem

Pro finální cyklizaci bylo použito 400 mg pryskyřice po předchozím kroku. Toto množství bylo přemístěno do skleněné vialky a reagováno s roztokem příslušného aldehydu - benzaldehydu (0,8 mmol; 82 µl), acetaldehydu (0,8 mmol; 45 µl), furfuralu (0,8 mmol; 66 µl) nebo pyridin-4-karbaldehydu (0,8 mmol; 75 µl) - v DMSO (4 ml). Do vialky bylo vloženo míchadlo a uzávěr byl překryt vrstvou parafilmu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku působením vyšší teploty. Takto připravené reakční nádoby byly umístěny do olejové lázně, kde byly zahřívány za konstantního míchání po dobu 72

hodin při teplotě 100°C. Po této době byla pryskyřice přesunuta zpět do plastové stříkačky a promyta 3x DMF a 3x DCM.

Analýza: viz 5.3.5 - Analýza.

7 (1,1,2,1): čistota 81,3 %; UHPLC-MS m/z = 441 [M+H]⁺

7 (1,2,1,2): čistota 69,6 %; UHPLC-MS m/z = 472 [M+H]⁺

7 (1,3,4,3): čistota 81,2 %; UHPLC-MS m/z = 433 [M+H]⁺

7 (2,4,3,4): čistota 71,7 %; UHPLC-MS m/z = 422 [M+H]⁺

5.3.8 Finální štěpení produktů, purifikace a NMR měření

Po posledním kroku syntézy byla veškerá pryskyřice s navázanými produkty opět přesypána do skleněných vialek. K těmto vzorkům byl přidán roztok TFA/DCM (1:1; 4 ml) a vialky byly s míchadly zahřívány a míchány na olejové lázni po dobu 2 hodin při teplotě 60°C. Po této reakci byla směs kvantitativně převedena do stříkačky, promyta 3x roztokem TFA/DCM (1:1) a přes fritu přefiltrována do nových vialek k odstranění štěpícího roztoku. To bylo prováděno analogicky jako při analýzách, tzn. pod proudem dusíku. Po odpaření kyseliny trifluoroctové a dichlormethanu byl odparek rozpuštěn v AcCN pro HPLC (4 ml) a přečištěn pomocí semipreparativního HPLC. Vyčištěný vzorek rozpuštěný v mobilní fázi byl poté na vakuové odparce zbaven acetonitrilu. Zbývající rozpouštědlo bylo odstraněno pomocí lyofilizátoru.

Čistá látka po lyofilizaci byla rozpuštěna v DMSO-d₆ (600 µl) a roztok byl poté kvantitativně převeden do kyvety pro NMR měření a potvrzení přesné struktury připraveného produktu a stanovení celkového výtěžku.

8 (1,1,2,1): Výtěžek nestanoven, látka v obsahu ≤ 1 mg. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.2 (s, 3 H) 1.52 - 1.60 (m, 4 H) 1.61 - 1.67 (m, 2 H) 4.13 - 4.24 (m, 4 H) 4.26 - 4.33 (m, 2 H) 5.04 - 5.10 (m, 1 H) 7.16 - 7.20 (m, 1 H) 7.21 - 7.29 (m, 4 H) 7.48 - 7.54 (m, 3 H) 7.57 - 7.62 (m, 2 H) 8.18 - 8.21 (m, 1 H) 8.48 (s, 1 H)

8 (1,2,1,2): Výtěžek 16 mg (44%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.38 - 0.45 (m, 3 H) 0.89 - 0.96 (m, 3 H) 2.95 - 3.06 (m, 1 H) 3.69 (t, *J*=4.87 Hz, 4 H) 4.09 - 4.30 (m, 4 H) 4.35 (dd, *J*=14.89, 5.73 Hz, 2 H) 4.60 (d, *J*=10.88 Hz, 1 H) 7.14 - 7.21 (m, 3 H) 7.22 - 7.28 (m, 2 H) 7.70 (d, *J*=5.73 Hz, 2 H) 8.29 (s, 1 H) 8.71 - 8.76 (m, 2 H) 8.92 (t, *J*=6.01 Hz, 1 H)

8 (2,4,3,4): Výtěžek 5,1 mg (14%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 0.73 (t, *J*=7.45 Hz, 3 H) 1.31 - 1.37 (m, 2 H) 2.12 - 2.18 (m, 6 H) 2.34 (t, *J*=4.87 Hz, 4 H) 2.90 - 3.07 (m, 3 H) 3.46 - 3.57 (m, 3 H) 4.08 (br. s., 4 H) 5.35 (dd, *J*=10.88, 5.15 Hz, 1 H) 6.89 - 6.94 (m, 2 H) 7.03 - 7.10 (m, 3 H) 7.92 (t, *J*=5.73 Hz, 1 H) 8.11 (s, 1 H)

6. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou nových purinových derivátů pro studium možné biologické aktivity. V teoretické části jsou popsány jednotlivé postupy pro syntézu purinového skeletu, možnosti derivatizace a také biologické účinky vybraných přírodních i syntetických derivátů. Krátce je také nastíněn princip syntézy na pevné fázi a postupy v ní využívané.

Ve výsledkové a diskuzní části je poté podrobně rozebrán návrh zvolené syntetické cesty pro cílové purinové deriváty, mající klíčové substituenty v polohách 6, 8 a 9. Pro tuto práci je nejdůležitější poloha 9 na dusíku. Do této polohy byly substituovány přírodní aminokyseliny ve formě amidů. Tyto aminokyseliny byly použity jako výchozí látky a sérií několika reakčních kroků byl na tyto struktury vystavěn purinový skelet s použitím široké škály vedlejších substituentů.

Experimentální část se zaměřuje na konkrétní chemické postupy využívané při syntéze cílových látek. Jsou zde uvedeny použité reagenty, rozpouštědla, chemické aparatury a přístroje, se kterými bylo během celé syntézy pracováno. Jsou zde také uvedeny výsledky analýz, čistoty a výtěžky pro jednotlivé meziprodukty i finální produkty.

Celkem byly v rámci zpracování práce připraveny 4 látky. Jako substituenty ve zvolených polohách byly vybrány aldehydy a aminy tak, aby byly cílové struktury rozmanité a pokryly tak varianty pro možnou přípravu chemických knihoven těchto látek. Další struktury a problematika budou dále řešeny v rámci diplomové práce, která bude na tuto práci navazovat.

7. Použité zkratky

DMSO	dimethylsulfoxid
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
DCC	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
HOBt	hydroxybenzotriazol
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DIC	N,N'-diisopropylkarbodiimid
DIEA	N,N-diisopropylethylamin
MeOH	methanol
DMF	dimethylformamid
DCM	dichlormethan
THF	tetrahydrofuran
TBAHS	hydrogensíran tetrabutylamonný
Fmoc-OSu	N-(9-Fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid
AcCN	acetonitril

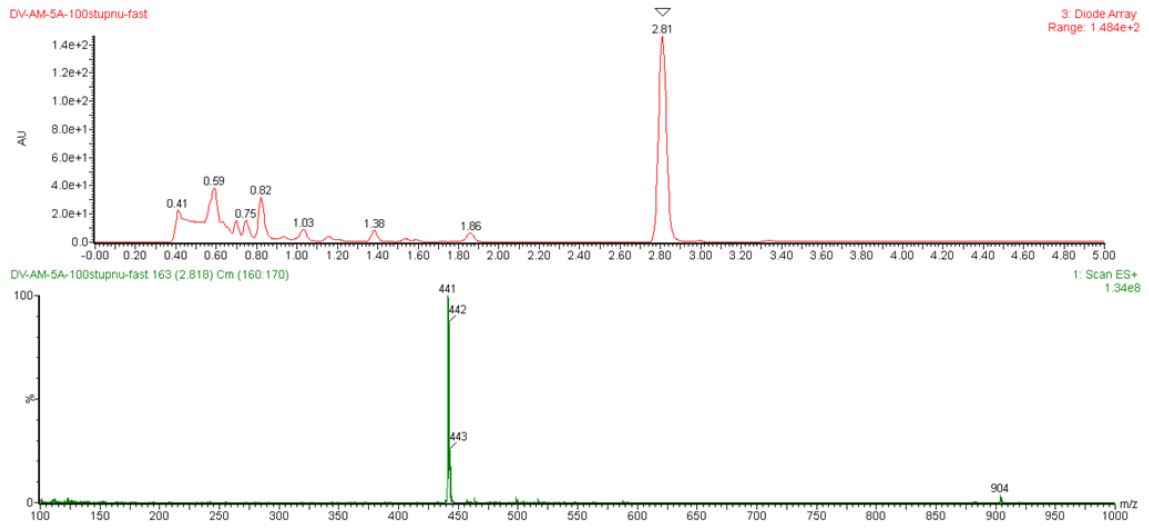
8. Literatura

1. Benich, A. et al.; *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76, 6073-7
2. Yamada, H; Okamoto, T.; *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1972**, 20, 623-4
3. Jacquet, O. et al.; *ChemCatChem* **2013**, 5, 117-120
4. Shaw, E.; *Journal of Biological Chemistry* **1950**, 185, 439-448
5. Luo, M. et al.; *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 8008-8017
6. Jain, M. L. et al.; *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 6472-5
7. May Chin Tan, T. et al.; *Journal of Combinatorial Chemistry* **2007**, 9, 210-218
8. Di Lucrezia, R. et al.; *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, 2, 249-253
9. Bork, J. T. et al.; *QSAR & Combinatorial Science* **2004**, 23, 245-260
10. Masefski, W. Jr. et al.; *Journal of American Chemical Society* **1990**, 112, 5350-1
11. Dervan, P. B.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, 9, 2215-2235
12. Sariri, R.; Khalili, G.; *Russian Journal of Organic Chemistry* **2002**, 38, 1053-5
13. Zajac, M. A. et al.; *Synthetic Communications* **2003**, 33, 3291-7
14. Patil, P. N.; *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2012**, 16, 76-83
15. Holmgren, P. et al.; *Forensic Science International* **2004**, 139, 71-73
16. Yashio, K. et al.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 115-119
17. Yamamoto, T. et al.; *Clinica Chimica Acta* **2005**, 356, 35-57
18. Velasco, J. et al.; *Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 5482-5491
19. Chang, T. et al.; *The New England Journal of Medicine* **2006**, 354, 1001-1010
20. Hammarström, L. G. J. et al.; *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 8071-3
21. Hammarström, L. G. J. et al.; *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 2823-7
22. Bach, S. et al.; *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 31208-31219
23. Veselý, J. et al.; *European Journal of Biochemistry* **1994**, 224, 771-786
24. Hikita, T. et al.; *Genes to Cells* **2010**, 15, 1051-1062
25. Celum, C. et al.; *Lancet* **2008**, 371, 2109-19
26. De Clercq, E. et al.; *British Journal of Pharmacology* **2006**, 147, 1-11
27. De Clercq, E. et al.; *Journal of Clinical Virology* **2004**, 30, 115-133
28. Emau, P. et al.; *AIDS Research and Therapy* **2006**, 3:29

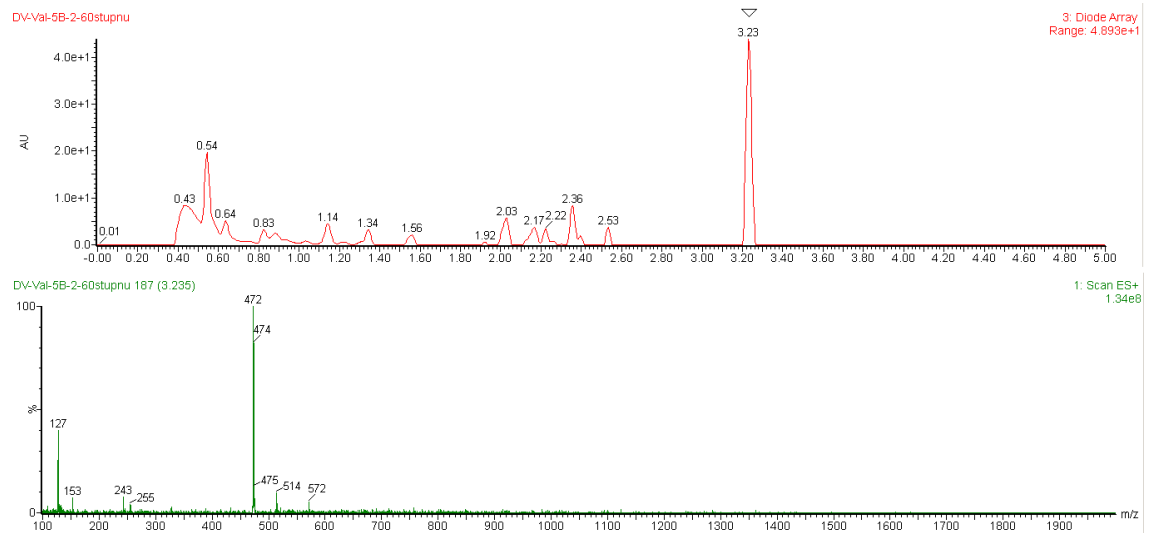
29. Schildgen, O. et al.; *The New England Journal of Medicine* **2006**, 354, 1807-1812
30. Galmarini, C. M. et al.; *Leukemia* **2001**, 15, 875-890
31. Saven, A. et al.; *Blood* **1998**, 92, 1918-1926
32. Giovanni, G. et al.; *The New England Journal of Medicine* **2010**, 362, 416-426
33. Rai, K. R. et al.; *The New England Journal of Medicine* **2000**, 343, 1750-7
34. Maltzman, J. S. et al.; *The Journal of Clinical Investigation* **2003**, 111, 1122-4
35. Baumgart, D. C. et al.; *Lancet* **2012**, 380, 1590-1605
36. Merrifield, R. B.; *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154
37. Hughes , A. B.; Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry
Vol. 3 - Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry
Weinheim: Wiley-VCH, **2011**, 273-312 ISBN 978-3-527-32102-5

Přílohy

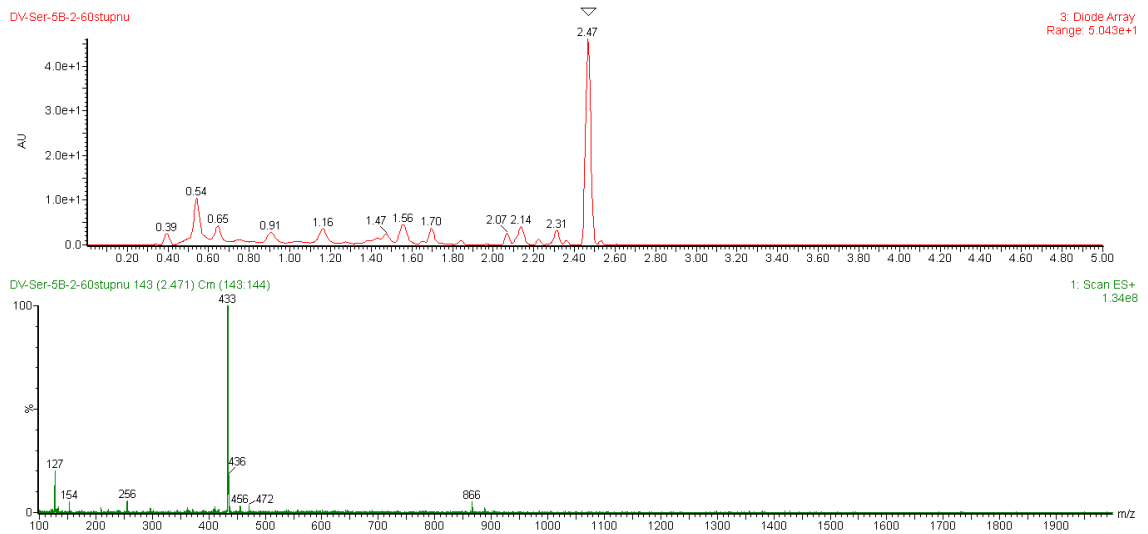
Příloha č. 1 : LC-MS analýza surového produktu **8** (1,1,2,1) po odštěpení z pryskyřice



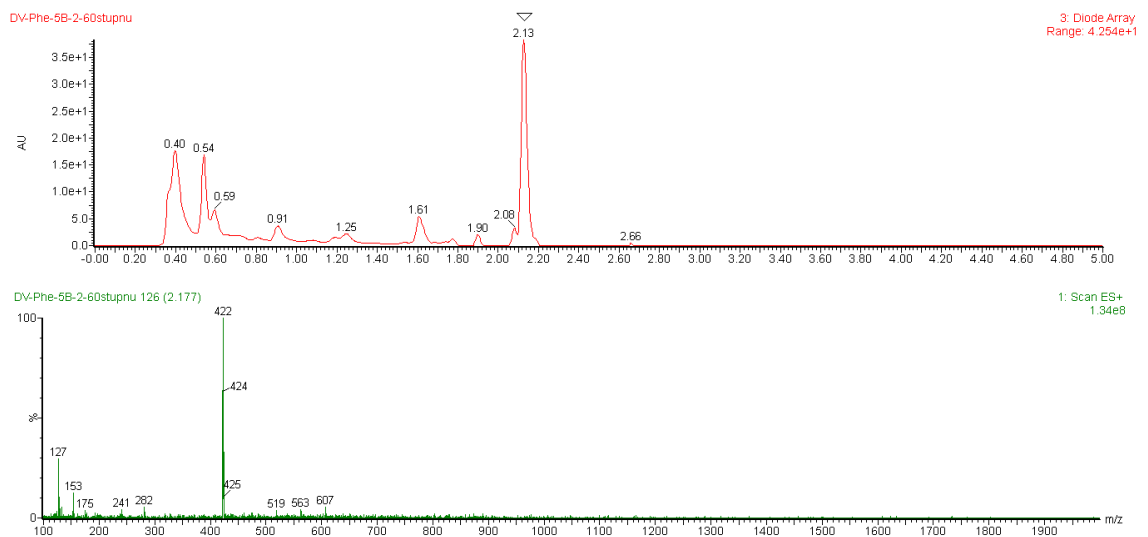
Příloha č. 2 : LC-MS analýza surového produktu **8** (1,2,1,2) po odštěpení z pryskyřice



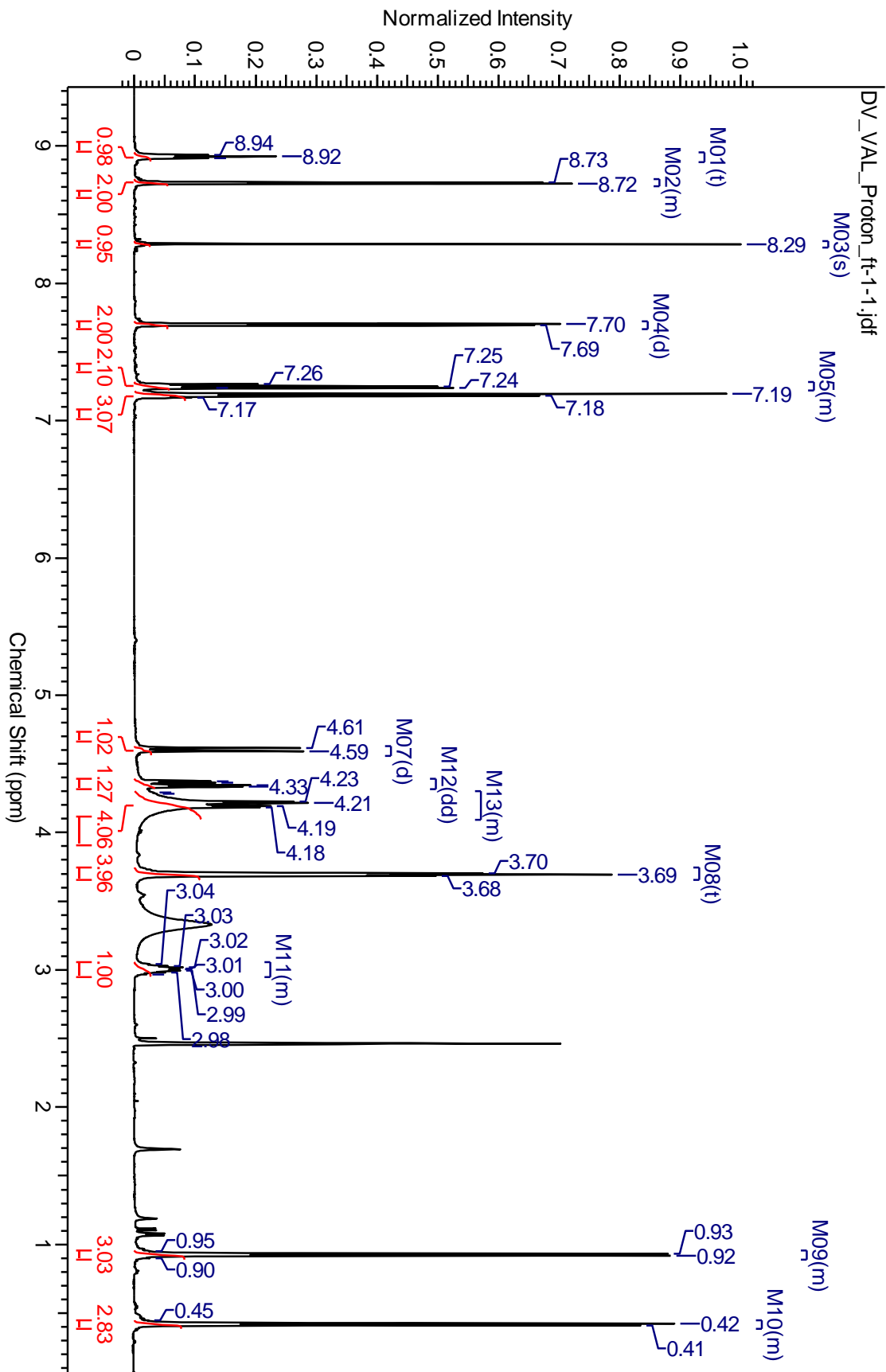
Příloha č. 3 : LC-MS analýza surového produktu **8** (1,3,4,3) po odštěpení z pryskyřice



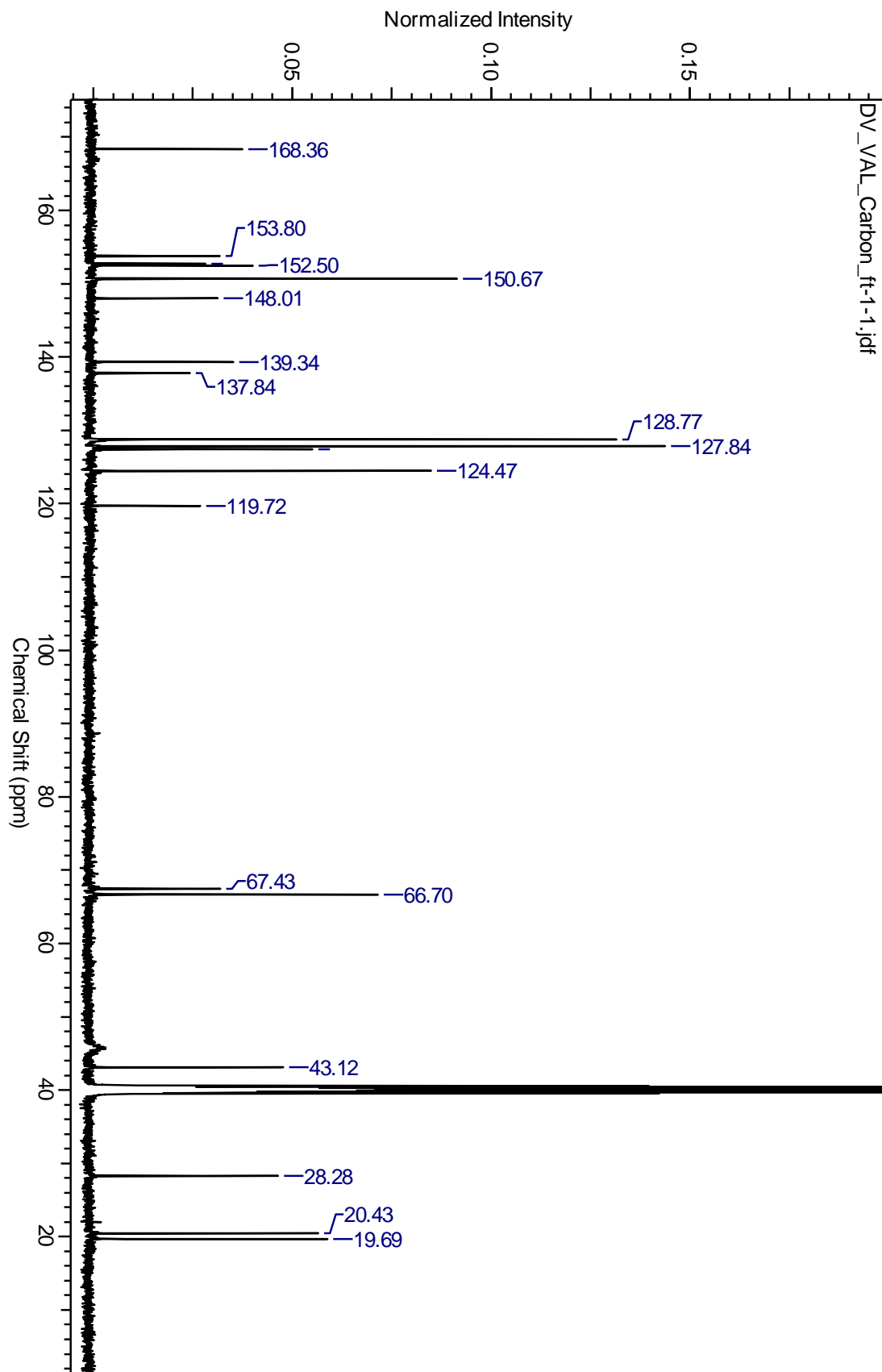
Příloha č. 4 : LC-MS analýza surového produktu **8** (2,4,3,4) po odštěpení z pryskyřice



Příloha č. 5 : ^1H NMR spektrum produktu **8** (1,1,2,1)



Příloha č. 6 : ^{13}C NMR spektrum produktu **8** (1,1,2,1)



Příloha č. 7 : ^1H NMR spektrum produktu **8** (2,4,3,4)

