

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Vývoj a optimalizace metody pro přípravu N^7 *terc*-alkylovaných derivátů 2,6-dichlorpurinu a jejich využití k přípravě příbuzných purinových analogů jako inhibitorů CDK

Bakalářská práce

Autor:	Michal Valenta
Studijní program:	R20619 Chemie
Studijní obor:	Chemie
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, 5.5.2023

.....

Podpis

Poděkování

Moc rád bych poděkoval svému naprosto skvělému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Jakobovi Stýskalovi, PhD. za všechny velice cenné zkušenosti v laboratorní praxi, které mi předal, veškerý čas, který se mnou při práci strávil, a úsilí vloženého do příkladného vedení práce. Dále si velmi vážím důvěry, ochoty, vstřícnosti a umožnění samostatné práce v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl rád poděkovat celému kolektivu Katedry organické chemie za příjemné pracovní prostředí a úžasnou atmosféru, kterých jsem mohl být součástí.

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA 2023 IGA_PrF_2023_20), které také patří mé díky.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Michal Valenta
Název práce:	Vývoj a optimalizace metody pro přípravu N^7 <i>terc</i> -alkylovaných derivátů 2,6-dichlorpurinu a jejich využití k přípravě příbuzných purinových analogů jako inhibitorů CDK
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel:	doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D
Rok obhajoby práce:	2023
Abstrakt:	<p>Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro přípravu 2,6-dichlorpurinu s <i>terc</i>-butylovým zbytkem v poloze N^7 a následně otestovat připravené příbuzné purinové analogy inhibitorů CDK na biologickou aktivitu.</p> <p>Teoretická část se zabývá problematikou CDK a syntézou a účinky 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Dále pak také obecnými metodami přípravy N^7-substituovaných purinů.</p> <p>V části Výsledky a diskuze se práce věnuje aplikaci metod popsaných v literatuře pro zavedení substituentů do polohy N^7. Je také diskutováno nalezení a propracování metody, která umožňuje regiosektivní zavedení <i>terc</i>-butylu do polohy N^7, jelikož takové sloučeniny nejsou příliš prozkoumané.</p>
Klíčová slova:	Cyklin-dependentní kinázy, <i>terc</i> -butyl, 7-(<i>terc</i> -butyl)-2,6-dichlorpurin, silylační metoda
Počet stran:	100
Počet příloh:	20
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Michal Valenta

Title: Development and optimization of a method for the preparation of N^7 *tert*-alkylated derivatives of 2,6-dichloropurine and their use for the preparation of related purine analogs as CDK inhibitors

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: 2023

Abstract: The main aim of this bachelor thesis was to develop and optimise method for preparation of 2,6-dichloropurine containing a *tert*-butyl residue in the N^7 position and subsequently to test the prepared related purine analoges of CDK inhibitors for biological activity.

The theoretical part deals with problematics of CDK and 2,6,9-trisubstituted purines synthesis and effects. Then with general methods for the preparation of N^7 -substituted purines as well.

In the part Results and discussion is devoted to application of the methods described in the literature for the introduction of substituents in the N^7 position. It is also discussed a finding and elaboration of a method, which allows the regioselective introduction of *tert*-butyl into the N^7 position, since such compounds have not been excessively inspected.

Keywords: Cyclin-dependent kinases, *tert*-butyl, 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichloropurine, silylation method

Number of pages: 100

Number of appendixes: 20

Language: Czech

Seznam zkratek:

4-MeOBnBr	4-methoxybenzylbromid
ACN	acetonitril
Bn	benzyl
BnBr	benzylbromid
BnCl	benzylchlorid
BnNH ₂	benzylamin
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimetylsilyl)acetamid
CDK	Cyklin-dependentní kináza
DBAD	di- <i>tert</i> -butyl-diazodikarboxylát
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCE	1,2-dichlorethan
DCM	dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
HMDS	bis(trimetylsilyl)amin
IPA	isopropylalkohol
py	pyridin
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TMSOTf	trimetylsilylester trifluormethansulfonové kyseliny
Tr	trityl
TrCl	tritylchlorid
<i>t</i> -BuOAc	<i>tert</i> -butylacetát
<i>t</i> -BuBr	<i>tert</i> -butylbromid

Obsah

1	Úvod a cíle práce	9
2	Teoretická část	11
2.1	Charakteristika cyklin-dependentních kináz a 2,6,9-trisubstituovaných purinových inhibitorů	11
2.1.1	Cyklin-dependentní kinázy	11
2.1.2	Klasifikace cyklin-dependentních kináz	13
2.1.3	Purinové inhibitory CDK	13
2.1.4	Buněčné působení 2,6,9-trisubstituovaných purinů	15
2.1.5	Syntéza 2,6,9,-trisubstituovaných purinů	16
2.2	Syntéza 7-substituovaných purinů	17
2.2.1	Metody přímé alkylace	18
2.2.1.1	Klasická metoda přímé alkylace	18
2.2.1.2	Přímá alkylace Mitsunobu metodou	18
2.2.1.3	Přímá alkylace pomocí Grignardových sloučenin	19
2.2.2	Metoda za použití N^9 chráněných 7,8-dihydropurinů	19
2.2.3	Cyklizační metody	21
2.2.3.1	Příprava N^7 -substituovaných purinů uzavřením imidazolového kruhu (pyrimidinové prekurzory)	21
2.2.3.2	Příprava N^7 -substituovaných purinů uzavřením pyrimidinového kruhu (imidazolové prekurzory)	22
2.2.4	Metoda alkylace přes purinové soli	23
2.2.5	Silylační metoda	24
3	Výsledky a diskuze	26
3.1	Příprava výchozích látek	27
3.1.1	Aplikace některých metod popsaných v literatuře	28
3.1.1.1	Klasická přímá alkylace	28
3.1.1.2	Přímá alkylace za použití Grignardových sloučenin	29

3.1.2	Aplikace silylační metody	30
3.1.2.1	Optimalizace silylační metody	31
3.1.2.2	Aplikace jiných Lewisových kyselin.....	35
3.1.2.3	Náhrada <i>tert</i> -butylbromidu za <i>tert</i> -butylacetát.....	36
3.1.2.4	Aplikace silylační metody na reakce s jinými halogenderiváty	38
3.2	Zkouška stability připravených <i>tert</i> -butylovaných prekurzorů	40
3.2.1	Zkouška kyselé a alkalické stability	40
3.2.2	Zkouška stability vlivem Lewisovy kyseliny SnCl ₄	41
3.3	Studium struktury připravených prekurzorů	43
3.4	Příprava <i>tert</i> -butylovaných analogů inhibitorů CDK	44
3.4.1	Reakce <i>N</i> ⁷ a <i>N</i> ⁹ <i>tert</i> -butylovaných prekurzorů s benzylaminem.....	44
3.4.2	Příprava finálních <i>N</i> ⁹ produktů (10), (13) a (15)	46
3.4.3	Příprava finálních <i>N</i> ⁷ produktů (8), (11) a (14)	48
3.4.3.1	Vliv rozpouštědla na přípravu finálních <i>N</i> ⁷ produktů.....	50
3.4.3.2	Otevírání imidazolového kruhu	52
3.5	Cytotoxická aktivita připravených sloučenin.....	53
4	Experimentální část.....	54
5	Závěr	72
6	Seznam použité literatury	74
7	Přílohy.....	81

1 Úvod a cíle práce

Purinové sloučeniny jsou přirozenou formou obsaženy v každé buňce, kde jsou součástí nukleových kyselin, které ovlivňují procesy živé hmoty.¹ Z tohoto pohledu je již po několik desetiletí věnována pozornost purinové chemii, kde se modifikací základního purinového skeletu hledají biologicky účinné látky. Takovými modifikacemi se podařilo připravit a uvést na trh sloučeniny, které se používají zejména jako virostatika nebo kancerostatika (tenofovir, adefovir, acyklovir, fludarabin, kladribin, karbovir, nelarabin, azatioprin atd.)²⁻⁴ (Schéma 1).

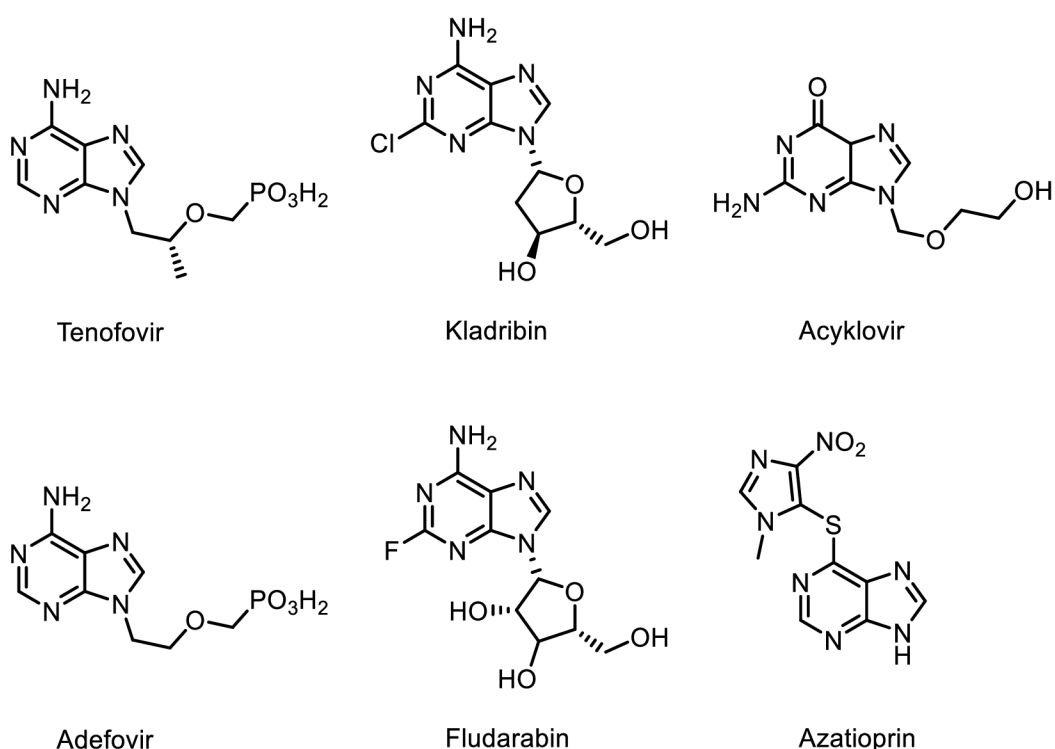


Schéma 1: Někteřá komerčně dostupná virostatika a kancerostatika

Purinovou chemií s ohledem na cílenou biologickou aktivitu se v současné době zabývá celá řada pracovišť, mimo jiné i UP a Laboratoř růstových regulátorů, kde byly ve vzájemné spolupráci nalezeny velice účinné 2,6,9-trisubstituované deriváty spadající do skupiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz (bohemín, roscovitin, olomoucín I a II). Cyklin-dependentní kinázy řídí buněčný cyklus, a proto se jeví jako zajímavé farmakologické cíle v terapii řady onemocnění včetně rakoviny^{5,6}.

Z pohledu substituce může být zajímavé připravit strukturně podobné deriváty lišící se pozicí substituentu především v poloze N^7 a pak také v poloze N^9 zavedením málo

popsaného *tert*-butylového zbytku a vzájemně pak srovnat jejich cytotoxickou aktivitu a CDK inhibici (Schéma 2).

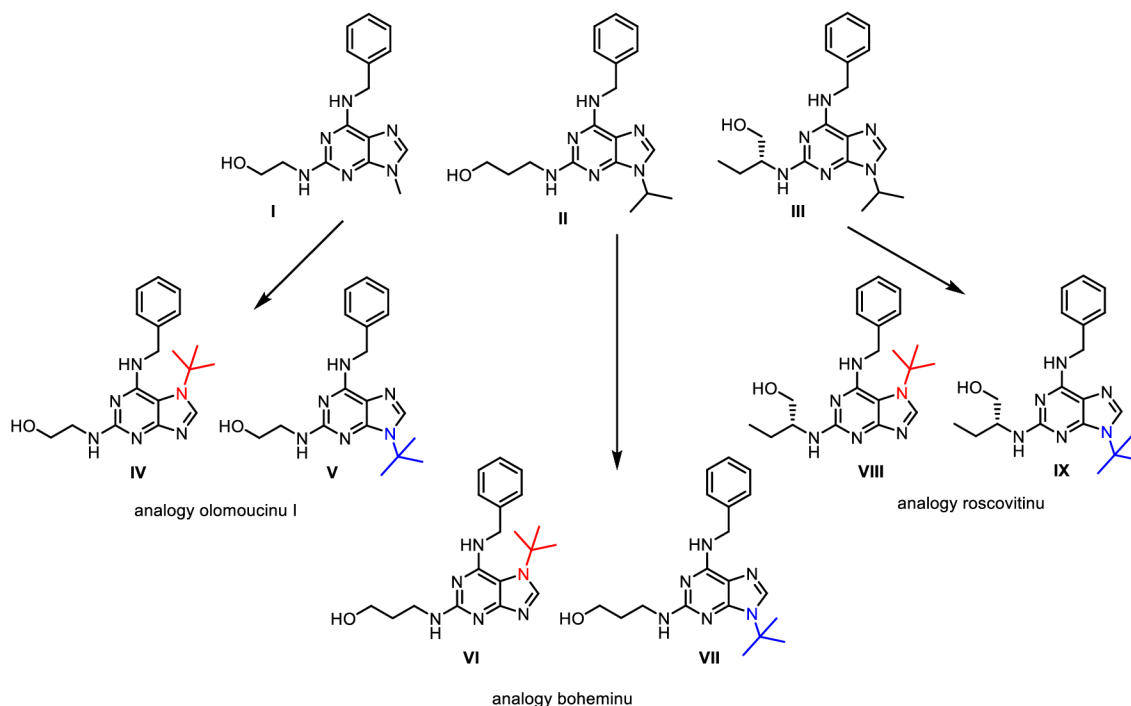


Schéma 2: Struktury požadovaných analogů purinových inhibitorů s *tert*-butylovým zbytkem

Princip přípravy je založen na regioselektivním zavedení *tert*-butylového zbytku do poloh purinu N^7 a N^9 a následné postupné substituci atomů chloru u 2,6-dichlorpurinu. Klíčovou věcí pro přípravu cílových látek je příprava purinových prekurzorů obsahujících *tert*-butylový zbytek. Proto je v prvním kroku nezbytné najít a optimalizovat vhodnou metodu, která poslouží k navázání tohoto terciárního alkyly s tím, že připravený prekurzor bude vznikat s dostatečnou konverzí ve vysokém výtěžku a čistotě. Příprava těchto sloučenin je sice v omezené míře známá, ale produkty vznikají v nízkém výtěžku a ve směsi, která se potom musí někdy i složitě dělit. Finální sloučeniny budou posléze otestovány na CDK inhibici a cytotoxickou aktivitu na vybraných nádorových a leukemických liniích.

2 Teoretická část

Hlavním cílem této bakalářské práce je vývoj a optimalizace chemické syntézy vedoucí k přípravě analogů purinových inhibitorů CDK (bohemín, olomoucín I, roscovitín), které obsahují v poloze N^7 *terc*-butylovou skupinu. Vzhledem k zaměření práce je tato hlavní kapitola rozdělena na dvě části. V první části je stručně nastíněna charakteristika CDK a jejich rozdělení a dále buněčné účinky a syntéza 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Ve druhé části se práce zabývá obecnými metodami přípravy N^7 -substituovaných purinů.

2.1 Charakteristika cyklin-dependentních kináz a 2,6,9-trisubstituovaných purinových inhibitorů

V první části této podkapitoly je představena problematika cyklin-dependentních kináz v souvislosti s jejich obecnou charakteristikou a rozřazením dle funkce. Ve druhé části je pak stručně popsána syntéza a biochemické účinky nejznámějších a dostupných purinových inhibitorů cyklin-dependentních kináz, které obsahují na svém skeletu v poloze 2 a 6 substituenty vázané přes atom dusíku a substituent v poloze N^9 .

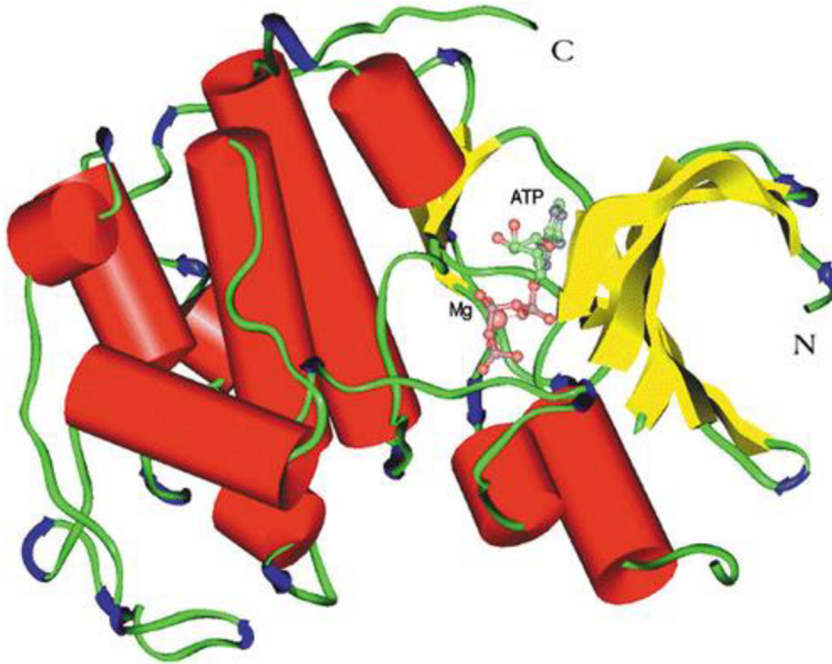
2.1.1 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklín-dependentní kinázy jsou důležitou skupinou enzymů podílejících se svou funkcí na regulaci buněčného cyklu. Jejich aktivitou je řízen proces dělení buněk. Každá z těchto kináz se skládá z katalytické podjednotky a regulační podjednotky.⁷⁻⁹ V rámci bližšího zařazení mezi kinázy se jedná o prolinem řízené serin a threonin proteinkinázy, které způsobují fosforylaci primární struktury bílkovin na jejich serinových a threoninových aminokyselinách.^{10,11}

Součástí aktivní holoenzymatické molekuly cyklin-dependentních kináz je tedy katalytická podjednotka (CDK1-CDK8) a dále regulační podjednotka (cyklin A-H), která zodpovídá za aktivaci celé kinázové podjednotky.⁹ Pojmenování samotných cyklinů souvisí s jejich cyklicky se měnící koncentrací, která stoupá a klesá během buněčného cyklu.¹²

Podobně jako jiné enzymy ze třídy kináz mají cyklin-dependentní kinázy dvoj-laločnatou strukturu tvořenou amino-koncovým a karboxy-koncovým lalokem. Bílkoviny amino-koncového laloku zaujímají strukturu beta-skládaného listu, zatímco bílkoviny karboxy-koncového laloku jsou v podobě alfa-helixů. Aktivní místo, kam se váže molekula ATP

nutné pro fosforylaci a případné inhibitory, se nachází mezi oběma laloky.^{9,11,13,14} Ilustrační příklad struktury pro CDK2 (obrázek 1).



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 Mg^{2+} . C-terminální doména sestává primárně z α -helixů (válců) a N-terminální doména sestává převážně z β -listů (stuh).⁹

Pro cyklin-dependentní kinázy je typické, že jsou ve své monomerní formě neaktivní, zároveň je tomu tak kvůli nízké koncentraci regulačních podjednotek.^{15,16} Aby mohla být cyklin-dependentní kináza aktivní, je nutné spojení s patřičným cyklinovým partnerem v dostatečné koncentraci. Při správném spárování katalytické a regulační podjednotky, kde se cyklinový protein váže do regulačního místa katalytické podjednotky, dochází ke konformačním změnám na molekule enzymu, a tak významně roste aktivita cyklin-dependentní kinázy.⁸ Tato regulace má za následek mimo jiné dvě zásadní funkce cyklin-dependentních kináz.

První funkcí je vhodné načasování aktivace cyklin-dependentní kinázy pomocí řízené exprese konkrétní cyklinové podjednotky.

Druhou je příspěvek cyklinů k substrátové specifitě katalytických podjednotek tvorbou konformačních změn na jejich povrchu.^{15,17-19}

2.1.2 Klasifikace cyklin-dependentních kináz

Buněčný cyklus sestává ze čtyř fází, které vedou od jednoho buněčného dělení k druhému. První fází je první přípravná fáze G1, kdy hned po předchozím dělení dceřiná buňka roste a vytváří si zásoby pro vlastní existenci. Následuje syntetická fáze S, při které se replikuje DNA. Třetí fází je druhá přípravná fáze G2, jež je závislá na předchozí replikaci DNA a zde se buňka připravuje na dělení. Čtvrtou fází je samotné dělení. Tato fáze nese označení mitotická fáze M, kdy dojde k rozdělení mateřské buňky na dvě dceřiné.²⁰

Buněčný cyklus a jeho samotná regulace je velmi složitý a komplexní proces. V buňkách více buněčných eukaryotických organismů se proto setkáme s větším zastoupením cyklin-dependentních kináz. Konkrétně v buňkách savců nalezneme 5 odlišných katalytických CDK podjednotek [CDK1 (známý také jako Cdc2), CDK2, CDK3, CDK4 a CDK6] a 10 odlišných regulačních cyklinových podjednotek [A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3, E1, E2, a F].¹⁹ Všechny tyto podjednotky se přímo účastní buněčného cyklu dělení. Každá cyklinová podjednotka, nebo jejich třída se váže na určité CDK podjednotky. Cykliny typu A vytvářejí komplexy s CDK1 a CDK2, které se během fáze S podílejí na replikaci DNA a napomáhají fázi G2. Cykliny typu B se spojují s CDK1 a mají důležitou roli v přechodu mezi fázemi G2 a M, kde pak zejména řídí procesy buňky v přípravě na mitózu. Cykliny typu D preferují tvorbu komplexů s CDK4 a CDK6. Vzniklé komplexy se účastní G1 fáze. Pozdní G1 a rané S fáze, respektive jejich přechodu, se pak účastní komplexy cyklinů typu E s CDK2. Tyto komplexy jsou nezbytné jako činitel pro zahájení replikace DNA.^{19,20}

2.1.3 Purinové inhibitory CDK

Kromě purinových inhibitorů existují i jiné struktury mající funkci zapříčinit v různé míře inhibici CDK, mezi ně patří například flavonoidy, indigoidy, staurosporiny a paullony.²¹ Tato práce se zabývá výhradně purinovými inhibitory, a proto zde nebudou ostatní struktury více zmiňovány. Inhibitory CDK na bázi purinového skeletu jsou známy již od 80. let minulého století, kdy byl hojně využíván 6-dimethylaminopurin, který však nevykazoval příliš vysokou specifitu. U 6-dimethylaminopurinu byl prokázán inhibiční účinek na CDK2 spojený s výraznou inhibicí mitózy buněk embrya mořského ježka.²²⁻²⁴ Screeningem dalších příbuzných purinů byl odhalen o něco zajímavější isopentenyladenin. Isopentenyladenin je rostlinný hormon (cytokinin) podporující dělení

rostlinných buněk, u nějž byla naměřena vyšší inhibiční aktivita, bohužel byl opět jako předešlý 6-dimethylaminopurin málo selektivní.²⁵ V nadcházejících letech byl ve spolupráci Univerzity Palackého a Laboratoře růstových regulátorů v Olomouci proveden výzkum dostupných analogů isopentenyladeninu a jiných substituovaných purinů na CDK1 / cyklin B inhibici. V rámci tohoto testování byla objevena látka nesoucí název 2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurin neboli olomoucín I.⁵ O olomoucínu I bylo zjištěno, že má vyšší účinnost a vyšší selektivitu pro CDK oproti 6-dimethylaminopurinu a isopentenyladeninu. Olomoucín I se chová jako kompetitivní inhibitor pro ATP a nekompetitivní inhibitor pro histon H1. Purinová specifita CDK inhibice byla testována později na 81 purinových derivátech, ovšem pouze ty, které byly 2,6,9-trisubstituované, vykazovaly silné inhibiční účinky.⁵ Studie olomoucínu I vedly brzy k objevu dalších neobvykle specifických inhibitorů, jako jsou bohemin a roscovitin.⁶ Konkrétně u roscovitinu je pak mnohem účinnější jeho R-enantiomer – R-roscovitin zvaný také seliciclib. S-enantiomer roscovitinu má menší inhibiční aktivitu vůči CDK2 a z hlediska tohoto výzkumu není tolik zajímavý.^{6,26} Výčet známých CDK purinových inhibitorů zobrazuje schéma 3.

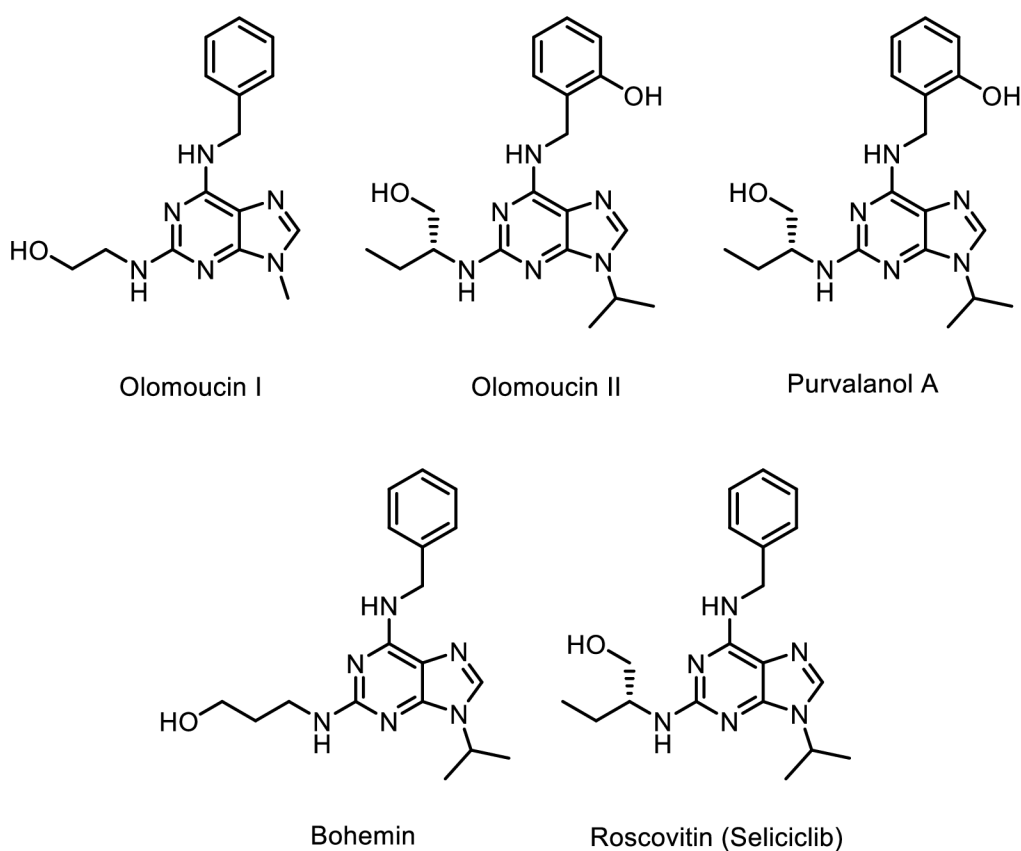


Schéma 3: 2,6,9-trisubstituovaná purinové inhibitory CDK

2.1.4 Buněčné působení 2,6,9-trisubstituovaných purinů

2,6,9-trisubstituované puriny působící jako inhibitory CDK mají čtyři hlavní účinky, kterými se podílejí na regulaci buněčného cyklu:

Zprvė jsou v závislosti na podmínkách schopné dobré inhibice množení buněk, jež vede k narušení pochodu buněčného cyklu ve fázi G1 a v přechodu mezi fázemi G2 a M. Tyto antiproliferační účinky jsou převážně způsobeny inhibicí CDK1 a CDK2.²⁵

Zadruhé je jejich účinkem vyvolána apoptóza mitotických buněk. Tato vlastnost je výrazně podpořena také přítomností dalšího inhibitoru jako v případě olomoucínu I a roscovitinu, které mají dohromady s inhibítořem farnesyltransferáza synergický efekt. Dále se podobně chová i purvalanol A s taxolem. Použití kombinace purvalanolu A a taxolu, kde taxol musí jako první zajistit mikrotubulární stabilizaci a purvalanol A poté inhibici CDK1, mělo za následek rozsáhlou apoptózu na linii HeLa buněk. (Buněčná linie HeLa je soubor epiteliálních nádorových buněk, které jsou speciální svou schopností se neustále a opakovaně množit a zajistit si tak nesmrtelnost díky účinné aktivaci telomeráz. Telomerázy jsou skupinou enzymů schopné dodatečně prodloužit v průběhu dělení zkrácené telomery určující délku života buněk). Při samostatné aplikaci taxolu a purvalanolu A, či jejich opět společné aplikaci jen v opačném pořadí však ke stejnému výsledku nedošlo. Oba pokusy zůstaly neúčinné a vyplynul tak závěr, že je třeba dbát na správné pořadí obou látek, aby bylo zajištěno správné působení.^{27,28}

Zatřetí mají schopnost diferenciaci nádorových buněk. Diferenciací se v tomto případě rozumí přeprogramování nádorové buňky zpět na buňku, která projde pouze omezeným počtem dělení. Cyklin-dependentní kinázy účastníci se růstového procesu buňky a dále související s diferenciací jsou CDK2, CDK4 a CDK6. Možným příkladem takto pozitivního diferenciačního účinku 2,6,9-trisubstituovaných purinových inhibitorů je in vitro diferenciaci myších erytro-leukemických buněk pomocí kombinované inhibice CDK2 roscovitinem a CDK6 p16. Ne však v případě inhibice CDK4 prostřednictvím p16, protože pouze kombinace inhibicí CDK2 a CDK6 spouští diferenciaci. Rovněž opačný sled inhibicí CDK2 a CDK6 zůstává bez kýženého diferenciačního účinku. Výsledky experimentů zabývajících se diferenciací myších erytro-leukemických buněk poukazují na fakt, že je vyžadováno specifické pořadí v inhibici CDK.²⁹

Začtvrté mohou chránit buňky před nechtěnými apoptózami. K ochraně před apoptózou dochází například v případě leukemických buněk potkana, kde je apoptóza způsobená

cAMP. Způsoby, jakými purinové inhibitory dosahují těchto účinků, ještě nejsou plně známy, ale mohou souviset se zastavením buněčného cyklu v případě neplánovaně vyvolané aktivity CDK, která apoptózu spouští.³⁰

2.1.5 Syntéza 2,6,9,-trisubstituovaných purinů

Jak již bylo několikrát zmíněno, 2,6,9-trisubstituované puriny jako je olomoucín I, bohemnin, roscovitin a další vykazují vysokou účinnost inhibičních účinků na CDK. V poloze 9 mají alkylový zbytek a v polohách 2 a 6 jsou substituované substituenty, které se na purinový skelet vážou přes atom dusíku. Při jejich přípravě se nejčastěji vychází z 2,6-dichlorpurinu. K výsledným produktům se dojde postupnými substitučními reakcemi, kde se využívá znalosti rozdílných reaktivit obou atomů chloru. Za zmínku stojí i to, že inhibici CDK v menší míře umožňují také 6,9-disubstituované purinové deriváty, jež se připravují obdobně jako 2,6,9-trisubstituované. Výchozí komponentou je v tomto případě nejčastěji 6-chlorpurin. Vzhledem k zaměření bakalářské práce se jejich přípravou a účinky dále tato práce nezabývá.

Substituované části struktur vážící se dusíkem na purinový skelet se mohou navázat několika možnými způsoby modifikace 2,6-dichlorpurinu. Obecně se ve většině případů pomocí S_N2 reakcí nejdříve substituuje reaktivnější chlor v poloze 6 za relativně mírnějších podmínek a potom za razantnějších podmínek atom chloru v poloze 2. Tyto kroky jsou následovány alkylační reakcí, kterou dochází na purinu v poloze N^9 k substituci vodíku na atomu dusíku za čistě alkylový substituent. Dalším způsobem může být zavádění alkyly do polohy N^9 na již připravený derivát substituovaný v poloze 6 a poté substituce za atom chloru v poloze 2. Existují také postupy příprav, kdy se v prvním kroku začíná alkylační reakcí do polohy N^9 .

Alkylace 2,6-dichlorpurinu zavádějící substituent do polohy N^9 se může potýkat s jistou komplikací, a to se vznikem směsi izomerů N^7 a N^9 kvůli nedostatečné regioselektivitě metody. Pro získání N^9 produktu se směs obou izomerů musí dále čistit opakovaně krystalizací nebo pomocí sloupcové chromatografie. Běžně používaná metoda za použití podmínek Mitsunobu couplingu prokázala ve většině případů dobrou regioselektivitu s dominujícím produktem substituovaným v poloze N^9 výsledně obdrženém ve vysokém výtěžku. Mitsunobu coupling upotřebuje jako alkylační činidla širokou škálu alkoholů, které mají oproti dříve konvenčně používaným alkylhalogenidům výhodu ve snížené tvorbě N^7 izomerů v reakční směsi a nejsou tolik toxické a karcinogenní. Při přípravě

derivátů tímto způsobem, mezi něž se řadí konkrétně i roscovitin, se v jeho případě namísto isopropylhalogenidu dává přednost isopropylalkoholu za vzniku 2,6-dichlor-9-isopropylpurinu. Reakce probíhá za laboratorní teploty, protože se zjistilo, že regioselektivitu nepříznivě ovlivňuje rostoucí teplota. Čištění surového produktu probíhá krystalizací z nižšího alkoholu nebo semi-preparativní chromatografií.^{31,32}

Další krok, příprava 2-chlor-6*N*-substituovaných-9-isopropylpurinů, je nukleofilní substituce S_N2 na C⁶ purinové pozici za použití vhodných aminů. Reakce se účastní triethylamin nebo *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylamin (Hunigovy báze), který se přidává jako doplňující pomocná báze, rozpouštědlem v prováděné reakci je *n*-propanol. Teplota reakce se pohybuje v rozmezí 80–100 °C a reakční doba kolísá mezi 3–6 hodinami v závislosti na nastavené reakční teplotě a reaktivitě použitého aminu. Surové meziproducty jsou čištěny krystalizací v isopropanolu s uspokojivými výtěžky (70-85 %) ve všech případech.³²

Posledním krokem přípravy je opět nukleofilní substituce S_N2 tentokrát na purinové pozici C². Tento krok probíhá již dříve popsanou metodou, kdy se vhodný aminoalkohol nebo amin dává v nadbytku (5–20 ekv.). Pomocná Hunigova báze se reakce účastní jen v několika případech. Pokud je ve snaze navázat stericky více bráněný aminoalkohol nebo amin, dávkuje se tato činidla v menším nadbytku (5–7 ekv.) za přítomnosti pomocné báze a *N*-methylpyrrolidonu majícím funkci rozpouštědla. Teplota reakce se udržuje okolo 150–160 °C a reakční doba se pohybuje od několika hodin pro reaktivnější aminoalkoholy a aminy (všechny C² roscovitinové aminové deriváty) do 72 hodin v případě méně reaktivních stericky více bráněných aminoalkoholů a aminů. Surové produkty jsou čištěny krystalizací v diethyletheru následovanou rekrystalizací ve směsi ethylacetátu a hexanu (1:2), nebo za použití semi-preparativní chromatografie. Výtěžky výsledných produktů se liší podle použitých reakčních činidel. V případě reaktivnějších aminoalkoholů a aminů je dosahováno dobré výtěžnosti mezi 60–80 % a pro stericky bráněné je to pouze mezi 20–40 %.³²

2.2 Syntéza 7-substituovaných purinů

V této podkapitole je stručně uveden výčet známých metod přípravy *N*⁷-substituovaných purinů.

2.2.1 Metody přímé alkylace

První možnou cestou k přípravě N^7 -substituovaných purinů je metoda přímé alkylace. Reakce je prováděna za přítomnosti báze v rozpouštědle, jakým je mnohdy aceton, acetonitril, DMF či DMSO. Co se týče používaných bází potřebných pro průběh reakce, je často mimo jiné využíván uhličitan draselný či sodný, nebo také v některých případech hydrid sodný. Určitou nevýhodou této metody je vznik směsi izomerů N^7 a N^9 v reakční směsi, kdy je ve velké většině převažující N^9 izomer. Oba produkty se potom musí od sebe oddělit sloupcovou chromatografií.^{33–38}

2.2.1.1 Klasická metoda přímé alkylace

Metoda přímé alkylace uvádí přípravy chtěných produktů, ve kterých je alkylační činidlo nejčastěji ve formě alkylhalogenidového derivátu. Vznik produktů v reakční směsi je regioselektivně posunut ve prospěch N^9 izomeru. Aby byl obdržen N^7 izomer, musí se směs dělit sloupcovou chromatografií. Možným případem je reakce 2,6-dichlorpurinu s benzylchloridem, kdy nejdříve 2,6-dichlorpurin reaguje 20 minut s uhličitanem draselným v DMF za inertních podmínek a poté se přidává benzylchlorid, se kterým reakce probíhá 20 hodin (Schéma 4). Oba reakční kroky jsou prováděny za laboratorní teploty. Výtěžnost N^7 izomeru **XI** je 18 %.³⁷

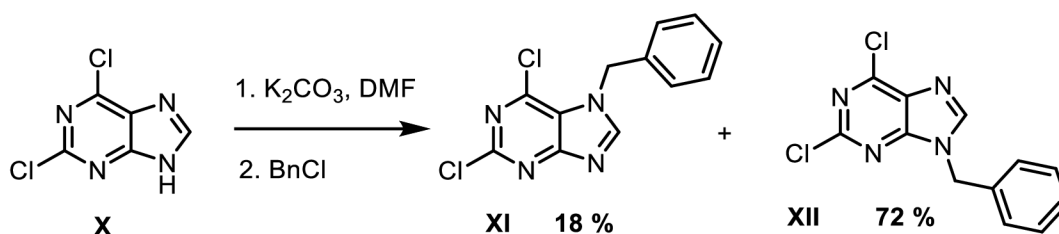


Schéma 4: Přímá alkylace.

2.2.1.2 Přímá alkylace Mitsunobu metodou

Při průběhu reakce za podmínek Mitsunobu reakce s alkoholy je pro N^7 -substituované puriny bohužel opět regioselektivitou upřednostněná substituce alkylu do polohy N^9 . Příkladem je zavádění isopropylového zbytku za použití isopropanolu v přítomnosti báze di-*tert*-butyl-diazodikarboxylátu (DBAD) a trifenyfosfinu v tetrahydrofuranu. Reakce běží za laboratorní teploty po dobu 20 hodin v inertní atmosféře (Schéma 5). Výsledná směs izomerů N^7 a N^9 je čištěna chromatograficky a N^7 izomer **XIII** je obdržen ve výtěžku pouze 10 %.³⁹

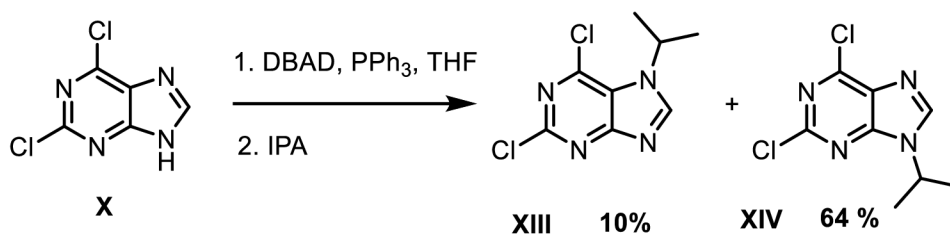


Schéma 5: Přímá alkylace Mitsunobu způsobem.

2.2.1.3 Přímá alkylace pomocí Grignardových sloučenin

Jedním z možných způsobů přímé alkylace je i rovněž alkylace za použití Grignardových sloučenin jako bází. Grignardovy sloučeniny umožňují na rozdíl od předchozích metod regioselektivní substituci do polohy N^7 díky své schopnosti se komplexovat s příslušným purinovým derivátem. Na selektivitu těchto alkyací byla zkoumána různá Grignardova činidla a s postupem času byl MeMgCl podobně jako *i*-PrMgCl, který není v komplexaci s LiCl, identifikován jako optimální báze poskytující selektivitu N^7/N^9 99:1. Bylo také zjištěno, že když byl protiion Grignardovy sloučeniny změněn z chloridu na bromid nebo jodid, konverze a selektivita pro tvorbu N^7 izomeru významně klesla. Produktem připraveným za podmínek alkylace Grignardovými činidly může být 2,6-dichlor-7-ethylpurin **XV**. 2,6-Dichlorpurin reaguje v prvním kroku 30 minut s MeMgCl při laboratorní teplotě v tetrahydrofuranu a inertní atmosféře. Během druhého kroku se přidává ethyljodid a reakce běží při zahřívání na 70 °C po dobu 16 hodin (Schéma 6). 2,6-Dichlor-7-ethylpurin je získán ve výtěžku 72 %.⁴⁰

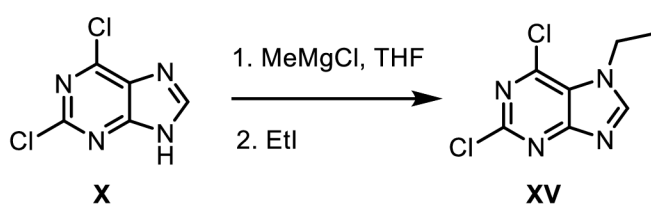


Schéma 6: Přímá alkylace za použití Grignardových sloučenin.

2.2.2 Metoda za použití N^9 chráněných 7,8-dihydropurinů

Tato víceokrová metoda syntézy N^7 substituovaných purinů vyžaduje nejprve protekci polohy N^9 vhodnou chránicí skupinou, pak redukcí imidazolové poloviny purinového skeletu, dále alkylační reakci s daným činidlem v přítomnosti báze pro získání kóžené struktury produktu do polohy N^7 , odstranění chránicí skupiny deprotekcí a v posledním kroku zpětnou oxidací pro obnovení aromaticity imidazolového kruhu. Obrovskou

výhodou této metody je její selektivita, díky čemuž je možné obdržet reakční směs, ve které se vedle N^7 izomeru neobjevuje N^9 izomer. Zaváděnými chránicími skupinami mohou být například benzyl, trityl nebo Boc.^{41,42}

Původně připravované 7,8-dihydropuriny obsahující v poloze N^9 chránicí skupinu ve formě benzylu a tritylu vykazovaly jistou komplikaci, a to že u nich byl později zjištěn sklon k nechtěné spontánní oxidaci za přístupu vzduchu zpět na patričný purinový derivát. 7,8-dihydropuriny s elektronakceptorními substituenty v polohách 2, 6, nebo 8 mají vyšší odolnost proti zpětné oxidaci. Skupina Boc, vázaná do polohy N^9 , byla zvolena z toho důvodu, že jako elektronakceptorní skupina podporuje tuto vlastnost snížením elektronové hustoty v cílené oblasti náchylné na oxidaci, a tím zvyšuje stabilitu potřebného meziprojektu. K deprotekcí Boc skupiny z polohy N^9 je poté, co proběhne alkylace, jednoduše dosaženo zajištěním kyselého prostředí stejně jako i v případě ostatních výše zmíněných chránicích skupin.⁴²

Jako příklad použití metody s N^9 chráněným 7,8-dihydropurinem je příprava 2,6-dichlor-7-(4-methoxybenzyl)purinu **XIX** za laboratorní teploty (Schéma 7 a schéma 8). 2,6-dichlorpurin je nejdříve v poloze N^9 selektivně ochráněn trityl chloridem za přítomnosti triethylaminu v bezvodém dichlormethanu. V dalším kroku probíhá redukce pomocí DIBAL-H, pak následuje v inertní atmosféře deprotonace hydridem sodným a alkylace 4-methoxybenzylbromidem v DMF. Odstranění tritylu je dosaženo přidáním trifluoroctové kyseliny v bezvodém dichlormethanu a reoxidace pak proběhne samovolně. Výsledný produkt je po čištění sloupcovou chromatografií obdržěn v 87% výtěžku.⁴¹

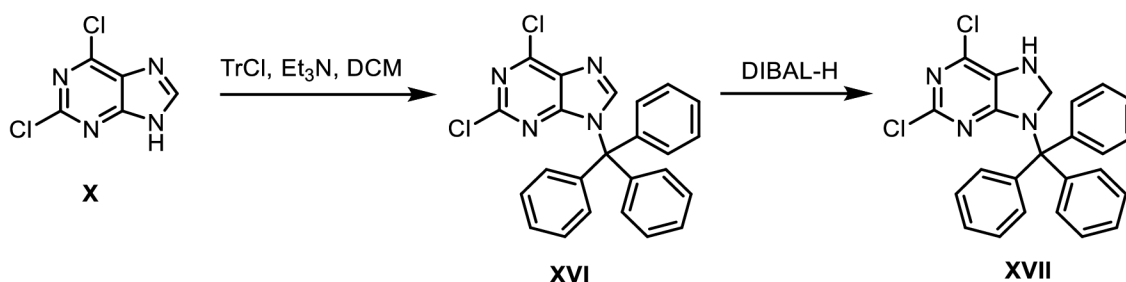


Schéma 7: Navázání chránicí skupiny a redukce.

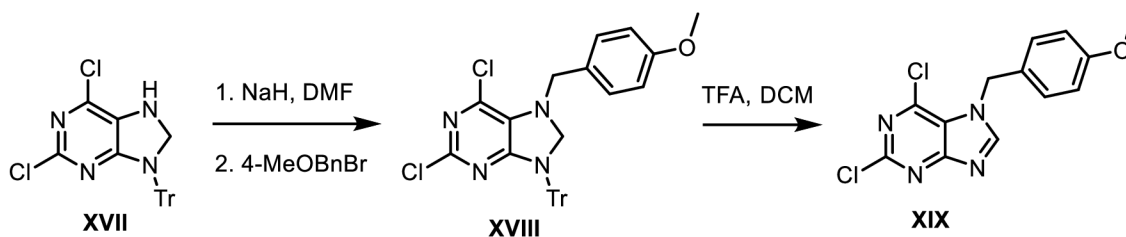


Schéma 8: Alkylace a odstěpení tritylu.

2.2.3 Cyklizační metody

Kromě předešlé metody existují také cyklizační přístupy, které vedou k přípravě produktu v podobě N^7 -substituovaného purinu bez tvorby jiného izomeru. Využívá se pyrimidinových a imidazolových prekurzorů s vhodně substituovanými postranními řetězci, jejichž cyklizací se uzavírá imidazolový, nebo pyrimidinový kruh.

2.2.3.1 Příprava N^7 -substituovaných purinů uzavřením imidazolového kruhu (pyrimidinové prekurzory)

Jednou z možností uplatnění pyrimidinových prekurzorů je postup podle vyvinuté metody, při které je cyklizace takovýchto sloučenin řízená zahříváním s formamidem. Aby mohlo dojít k cyklizaci tzv. 5-pyrimidinylformamidů na požadovanou purinovou strukturu, je třeba je nejdříve připravit pomocí alkyhalogenidů reagujících s vhodnými N -(4-amino-5-pyrimidinyl)formamidy. Alkylační reakce probíhá v běžně používaném alkylačním rozpouštědle N,N -dimethylformamidu a účastní se jí uhličitán draselný jako báze.

Cyklizačním způsobem z pyrimidinového derivátu se dá připravit již výše zmíněný 7-benzyl-2,6-dichlorpurin **XI** (kapitola 2.2.1). Potřebný 5-pyrimidinylformamid **XXI** se získá formylační reakcí v 98% kyselině mravenčí za laboratorní teploty z 4,5-diamino-2,6-dichlorpyrimidinu. V dalším kroku reakce reaguje benzylchlorid s meziproductem **XXI** po dobu tří dnů při laboratorní teplotě, během tohoto děje dochází k částečné cyklizaci alkylací formamidu za vzniku směsi produktů **XXII** a **XI** (Schéma 9). Chtěný produkt byl izolován ve výtěžku 45 % v surovém stavu.⁴³

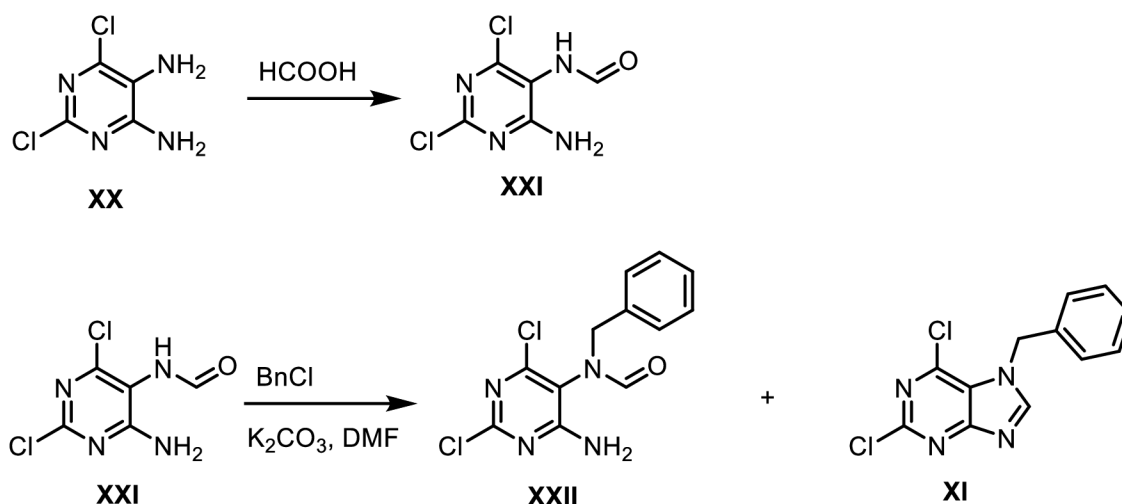


Schéma 9: Cyklizace imidazolového kruhu

2.2.3.2 Příprava N^7 -substituovaných purinů uzavřením pyrimidinového kruhu (imidazolové prekurzory)

Jak bylo patrné z úvodní podkapitoly o cyklizačních reakcích, N^7 -substituované puriny lze připravit uzavřením také pyrimidinového kruhu. Substituované 4(5)-amino-5(4)-kyanoimidazoly jsou všestrannými výchozími komponentami pro syntézu purinových systémů. Zkombinování elektrofilní kyano skupiny, která má prostorově nejbliž k nukleofilní amino skupině, ústí v jednokrokovou adičně-cyklizační reakci elektrofilů za poskytnutí purinových analogů. Alkylace výše jmenovaných reaktantů má za následek tvorbu izomerů v reakční směsi a je nutné je pečlivě oddělit chromatografickou separací.

Jako uváděný příklad, kdy je k přípravě N^7 -substituovaného purinu použit imidazolový prekurzor, je příprava 7-benzyl-6-methylamino-2-methyldithiocarbamylpurinu **XXIV**. Předem připravený a izolovaný 4-amino-1-benzyl-5-kyanoimidazol **XXIII** reaguje v pyridinu s nadbytkem methylisokyanátu při refluxu po dobu jedné hodiny a půl (Schéma 10). Po rekrystalizaci ze směsi rozpouštědel methanol-ether byl získán produkt s výtěžkem 43 %.⁴⁴

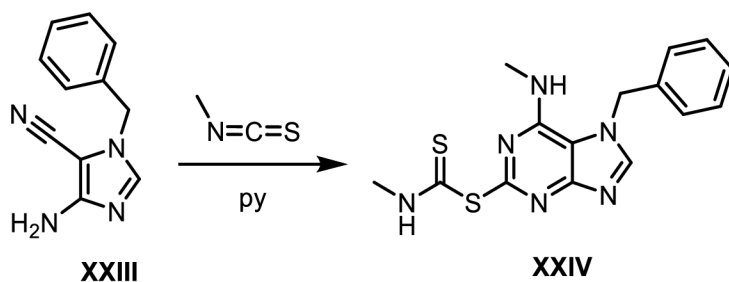


Schéma 10: Cyklizace pyrimidinového kruhu

2.2.4 Metoda alkylace přes purinové soli

Další možnou metodou přípravy N^7 -substituovaných purinů je prostřednictvím purinových solí, které se během reakce tvoří. Základem je selektivně obsazená poloha N^9 s navázanou chránicí skupinou. Chránicí skupina by měla v tomto případě vykazovat určitou nestabilitu, aby ji bylo možné snadno odštěpit, může jít o ribosu⁴⁵, difenylmethyl⁴⁶, acetyl⁴⁷, trityl⁴⁸, trimethylsilyl⁴⁹ nebo *p*-methoxybenzyl⁵⁰. Potom, co je takováto sloučenina připravena, se provádí alkylace, při které vznikají purinové soli a jejich následným štěpením pak vznikají N^7 -substituované purinové produkty. K deprotekcí dochází buď samovolně během reakčního procesu, nebo je tomu dopomoženo kyselým prostředím.

Metodou alkylace přes purinové soli lze například připravit 7-[(2-chlorethoxy)methyl]guanin **XXVIII**. Guanin a síran amonný jsou ponechány v HMDS při refluxu po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo je odpařeno a odparek znovu rozpuštěn v acetonitrilu, kam se přidává tritylchlorid. Reakce je míchána za laboratorní teploty po dobu 7 hodin. V dalším kroku je po izolaci meziprojektu **XXVI** přidán (2-chlorethoxy)methylchlorid v DMF. Reakce běží opět za laboratorní teploty po dobu 8 hodin (Schéma 11). Výsledný produkt je získán po konečném čištění sloupcovou chromatografií v 88% výtěžku⁴⁸.

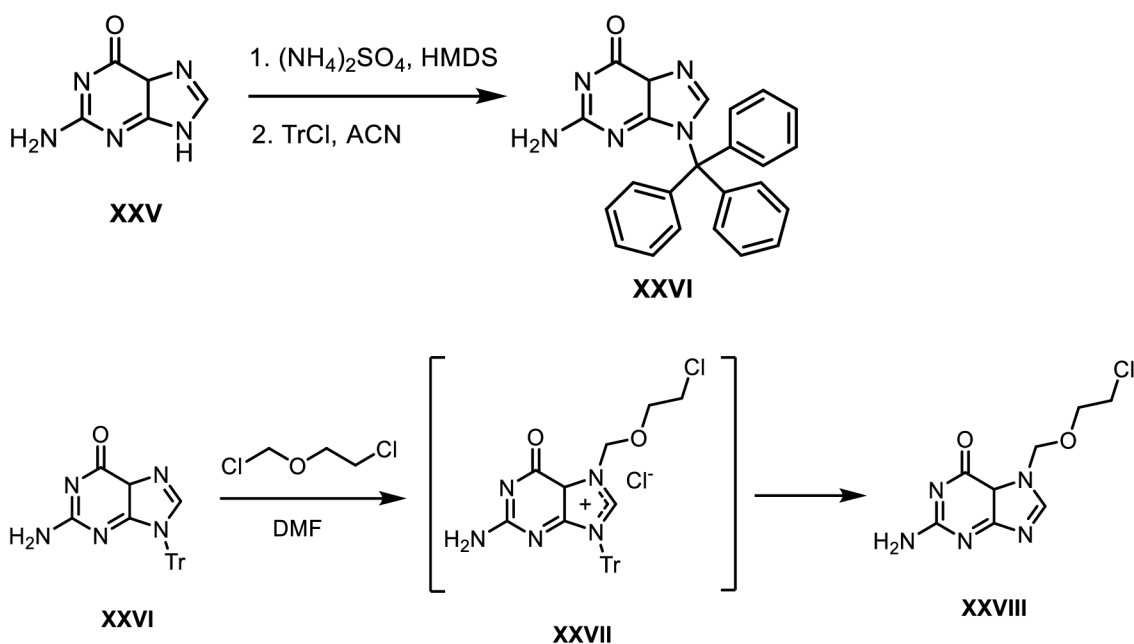


Schéma 11: Alkylace přes purinovou sůl s tritylovou skupinou

2.2.5 Silylační metoda

Tato metoda se používá ve větším měřítku především k přípravě pyrimidinových a purinových nukleosidů. Ve spojitosti s purinovými sloučeninami pak může sloužit k navázání glykosylů. Při reakci dochází v reakční směsi k tvorbě izomerů N^7 a N^9 s rozdílnou regioselektivitou v závislosti na substrátu, teplotě, rozpouštědle, reakční době, katalyzátoru a i na množství reagujících komponent. Každou změnou reakčních podmínek je možné korigovat regioselektivitu, a tedy i to jestli bude predominovat jeden či druhý izomer. Obecně klíčovou roli má především teplota a reakční doba, protože N^7 izomer je kineticky stabilní, zatímco N^9 izomer je zase stabilní termodynamicky.^{51,52} Silylační metoda prošla v průběhu let různými modifikacemi, jednou z nich je důležitá Vorbrüggenova metoda, díky které se dnes jako katalyzátory používají nejvíce Lewisovy kyseliny, do nichž se mimo jiné řadí třeba SnCl_4 , TiCl_4 , trimethylsilyltriflát (TMSOTf). Další modifikací byla záměna teplotně nestabilních halogensacharidů za peracetylované sacharidy jako reakční činidla.⁵¹ Podstatné je zmínit, že i když za daných podmínek vznikne přednostně jeden z izomerů, například N^9 , tak s jiným reaktantem může predikovaná regioselektivita při reakci klesat^{53,54}, nebo může dokonce dojít k jejímu obrácení ve prospěch N^7 izomeru.⁵⁵⁻⁵⁸

Příkladem použití silylační metody pro zavádění glykosylů na purinový skelet je příprava 2,6-dichlor-7-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranozy)purinu **XXX** (Schéma 12).

2,6-dichlorpurin musí nejdříve reagovat v bezvodém 1,2-dichlorethanu s *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamidem (BSA) po dobu 30 minut při 76–80 °C za inertních podmínek. V druhém kroku je reakční směs zchlazena v ledové lázni a přidává se SnCl₄, dále reakce běží za laboratorní teploty 30 minut a následně se přidává 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-*D*-glukopyranoza. Reakce je míchána za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Výše jmenovaný produkt je po chromatografickém čištění obdržen ve výtěžku 42 %.⁵⁹

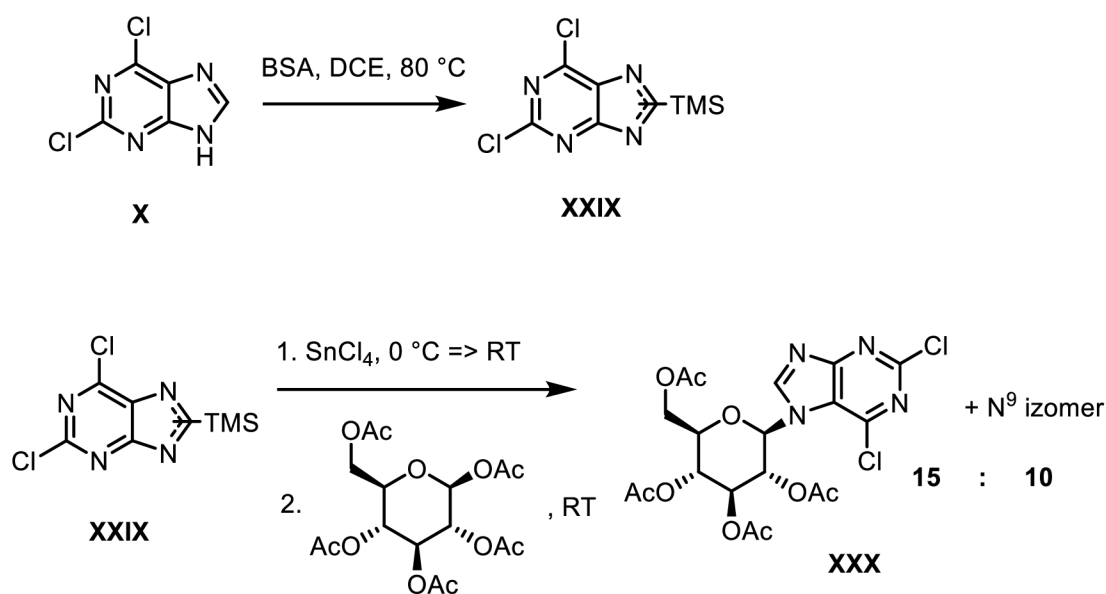


Schéma 12: Silylační reakce s 2,6-dichlorpurinem

Jako srovnání výsledku předchozí reakce při změnách reakčních podmínek může sloužit příklad přípravy 6-dichlor-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-glukopyranozyl)purinu **XXXII** (Schéma 13). V reakci místo SnCl₄ figuruje TiCl₄ a výchozí látkou je 6-chlorpurin, jinak jsou všechny ostatní podmínky a kroky postupu stejné. Zajímavé přitom je, že je v reakční směsi pozorován pouze regioselektivně zcela upřednostněný *N*⁷ izomer. Výsledný produkt je čištěn chromatograficky s 60% výtěžkem.⁵⁹

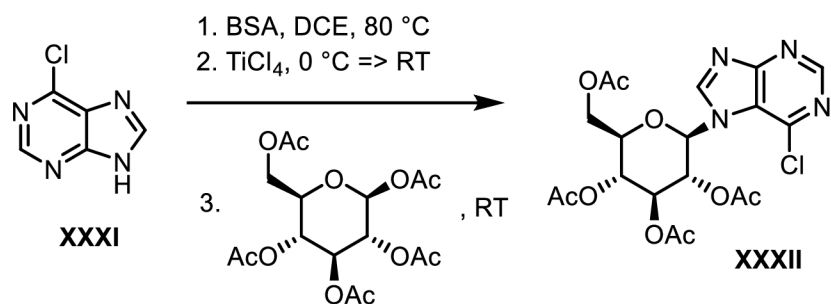


Schéma 13: Silylační reakce s 6-chlorpurinem

3 Výsledky a diskuze

Tato bakalářská práce si klade za jeden z hlavních cílů především vývoj metody pro výslednou syntézu purinových analogů olomoucínu I, boheminu a roscovitinu sloužících jako potencionální inhibitory cyklin-dependentních kináz, které ponесou v poloze N^7 ale i v poloze N^9 *tert*-butylový zbytek. Ohledně zavádění *tert*-butylového postranního řetězce či obecně terciárních skupin se z běžně dostupné literatury nedá vyčíst příliš mnoho a literatura je v tomto směru prozatím omezena pouze na ojedinělé případy, neboť purinové sloučeniny s terciárním zbytkem jsou stále nedostatečně prozkoumané. Důvodem je zejména problematičnost zavádění takovýchto postranních struktur na purinový skelet.

Princip přípravy již zmíněných analogů strukturně podobným olomoucínu I, boheminu a roscovitinu bude založen na obdobné klasické postupné substituci popsané dříve (kapitola 2.1.5) vycházející z 2,6-dichlorpurinu (**1**), kdy v první řadě dojde ke vzniku *tert*-butylovaného prekurzoru a dále sekvencí nukleofilních substitucí za atomy chloru v polohách 6 a 2 k výsledným 2,6,7- respektive 2,6,9-trisubstituovaným purinovým analogům (Schéma 14). Aby bylo možné dospět k finálním produktům, bude zapotřebí nejprve najít a propracovat syntetický přístup ke oněm *tert*-butylovaným prekurzorům.

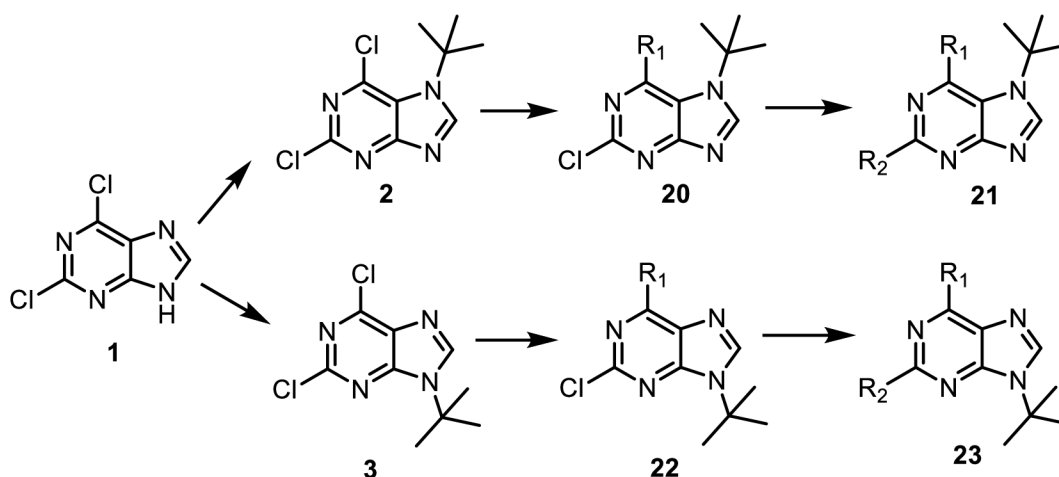


Schéma 14: Postup přípravy výsledných produktů

Snahou bude také tyto sloučeniny otestovat na biologickou aktivitu ve spojitosti s CDK a cytotoxickou aktivitou na nádorových buněčných liniích. Předmětem zájmu bude sledovat úlohu *tert*-butylové skupiny, jak a zda vůbec se pozitivně zapojuje do inhibičních

procesů a ovlivní tak biologickou aktivitu, z čehož pak bude věcně vyvodit patřičný závěr (Schéma 2).

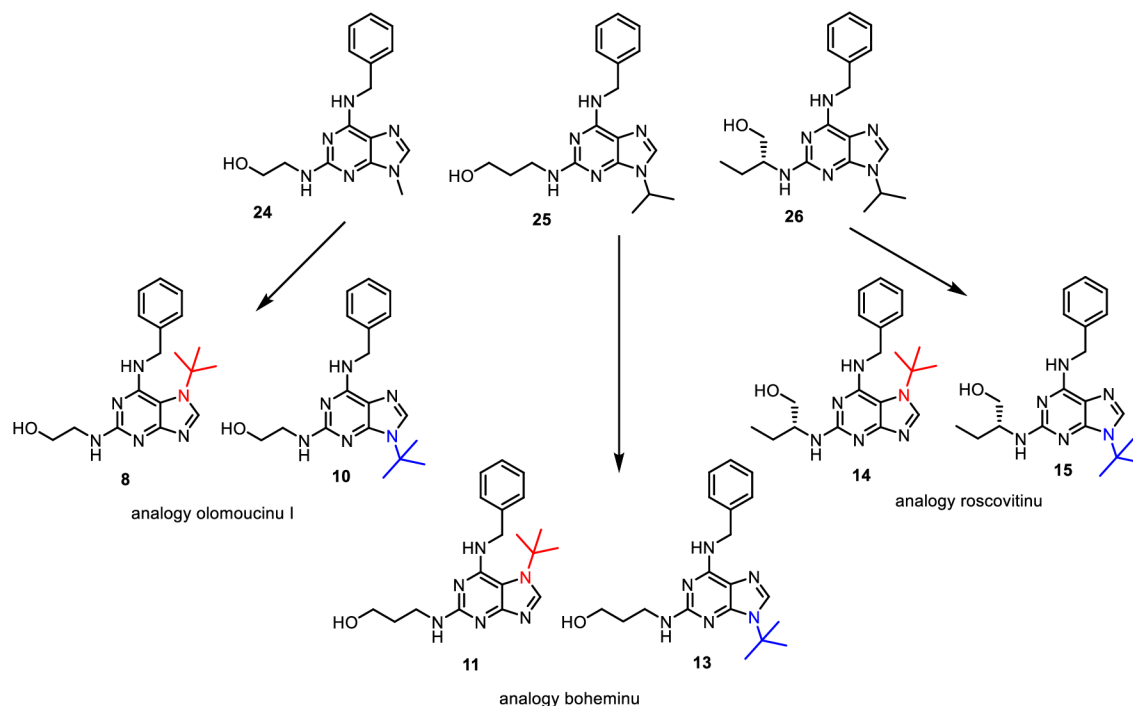


Schéma 2: Struktury požadovaných analogů purinových inhibitorů s *tert*-butylovým zbytkem

3.1 Příprava výchozích látek

Důležitou látkou pro celý postup v syntéze až ke kýženým produktům je již několikrát zmiňovaný prekursor s navázaným *tert*-butylovým zbytkem jak přednostně v poloze N^7 , tak i v poloze N^9 . Struktura 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**2**) a 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**3**) je sice už nějakou dobu známá, ale jejich příprava se v rámci snahy o získání čistě daného produktu potýká s jistou komplikací, při kterém vznikají směsi více izomerů, jež je nutné podrobit pečlivé a složité separaci a čištění, a navíc se chtěné produkty tvoří s nízkou konverzí a výtěžkem (Schéma 15).³⁸ Proto je cílem práce pokusit se najít způsob, jak přednostně regioselektivně zavést terciární zbytek do polohy N^7 u 2,6-dichlorpurinu (**1**).

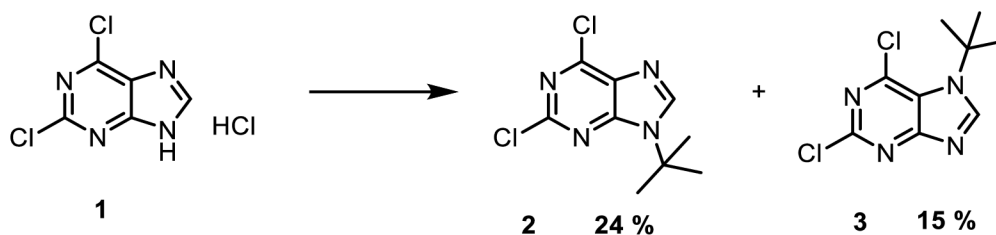


Schéma 15: Tvorba izomerů při přípravě *tert*-butylovaných 2,6-dichlorpurinů

3.1.1 Aplikace některých metod popsanych v literatuře

Hlavní důraz u přípravy *tert*-butylovaných prekurzorů je kladen na optimalizaci již částečně prozkoumané silylační metody. Z tohoto pohledu bylo ovšem nejdříve vyzkoušeno pár metod přímé alkylatione pro ověření jejich použitelnosti na zavádění terciárních zbytků. Metoda za použití 7,8-dihydropurinů (viz kapitola 2.2.2) nebyla zkoušena z důvodu již dříve neúspěšné aplikace zavádění *tert*-butylové skupiny alkylatione u 6-chlorpurinu.⁶⁰

3.1.1.1 Klasická přímá alkylatione

Touto metodou přímé alkylatione za použití halogenderivátu jako alkylationečních činidel a v přítomnosti báze, jakou může být například uhličitan draselný, lze sice dojít jednokrokovou syntézou k N^7 -substituovaným purinům v reakční směsi, ovšem je nezbytné počítat s faktem, že výsledek nebude ideální, protože v průběhu reakce vzniká směs izomerů N^7 a N^9 a k tomu druhý jmenovaný je vždy dominantní. Metoda je také vyzkoušena jenom pro primární a sekundární alkylatione zbytky, a proto bylo zajímavé ji použít i v případě zavedení terciárního.

Přímá alkylatione byla tedy aplikována na zavedení *tert*-butylu, kdy bylo pro tento alkyl použito činidlo *tert*-butylbromid. Bylo zahájeno několik sérií reakcí, v nichž roli báze plnil uhličitan draselný, 60% hydrid sodný a DBU. Všechny reakce probíhaly v rozpouštědle DMF a v případě uhličitanu draselného také v DMSO. Reakce probíhaly za laboratorní teploty a při 80 °C po dobu 24 hodin (Schéma 16).

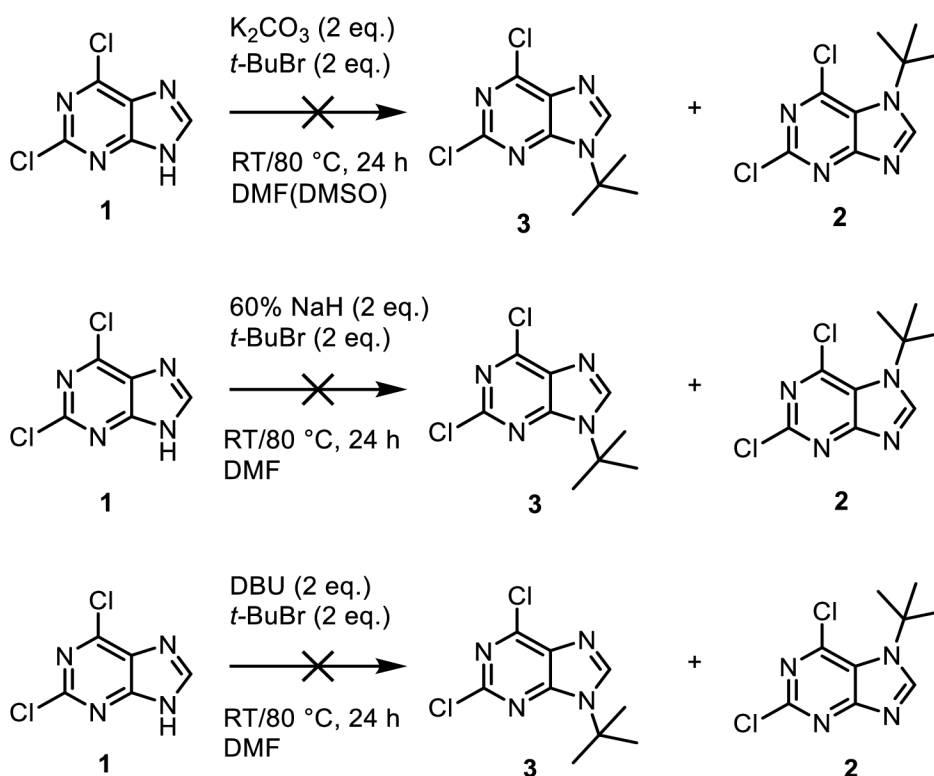


Schéma 16: Přímá alkylace s použitím *tert*-butylbromidu

Z LC/MS analýz týkajících se všech prováděných reakcí bylo patrné, že žádná reakce nenastala. Metoda přímé alkylace za standardního užití tedy není vůbec vhodná pro navázání *tert*-butylového zbytku na skelet 2,6-dichlorpurinu ani do polohy N^7 , ani polohy N^9 .

3.1.1.2 Přímá alkylace za použití Grignardových sloučenin

Další metodou přímé alkylace je přímá alkylace za použití Grignardových činidel, u které se obecně předpokládá vyšší regioselektivita do polohy N^7 . Samozřejmě i v tomto případě mohou vznikat směsi izomerů N^7 a N^9 , ale vhodnou volbou reakčních podmínek, kde hodně záleží na typu použitého Grignardova činidla, je možné posunout regioselektivitu až téměř úplně ve prospěch izomeru N^7 . Na základě vybrané literatury byl zvolen MeMgCl .³⁸ V této literatuře se autoři nijak nezmiňují o zavádění terciárních zbytků, jen o zavádění primárních a sekundárních, a tak nastala příhodná situace jejich metodu ověřit pro účely této práce a pokusit se podle predikce regioselektivity připravit 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (3).

Aby bylo jisté, že reakce bude probíhat, byla tato metoda popsána v literatuře nejprve zkoušena na reakci 2,6-dichlorpurinu s benzylbromidem. Rozpouštědlem byl bezvodý

THF a Grignardovou sloučeninou zajišťující deprotonaci MeMgCl. 2,6-Dichlorpurin v prvním kroku reagoval 30 minut s MeMgCl při laboratorní teplotě a poté byl přidán benzylbromid. Reakce s benzylbromidem běžela 27 hodin při 70 °C (Schéma 17).

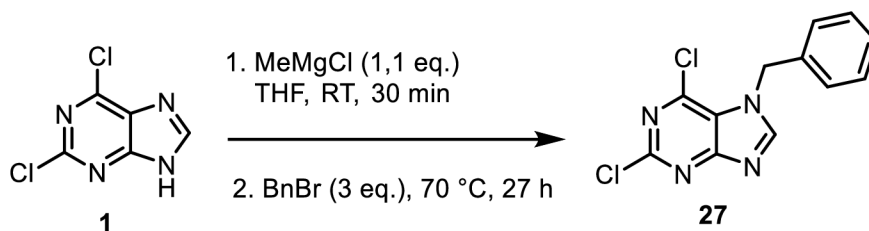


Schéma 17: Přímá alkylace benzylbromidem za použití Grignardových činidel

Na LC/MS analýze byly z chromatogramu vidět čtyři píky, z nichž dva měly stejnou hodnotu molekulové hmotnosti odpovídající produktu, kde jeden představoval izomer N^7 a druhý s vyšším retenčním časem izomer N^9 v poměru 9,4/1 (N^7/N^9). U zbývajících dvou píků se zřejmě jednalo o adukty, které ale nebyly hlouběji zkoumány. Konverze výchozí látky byla téměř úplná (98%).

Po zdařilé reprodukci popsané reakce s benzylbromidem byl stejný postup metody použit i pro *tert*-butylbromid (Schéma 18).



Schéma 18: Přímá alkylace *tert*-butylbromidem za použití Grignardových činidel

Po LC/MS analýze byly identifikovány dva píky se stejnou molekulovou hmotností, které opět odpovídaly produktům ve formě izomerů N^7 a N^9 spolu s korespondujícím vyšším retenčním časem izomeru N^9 . Obdržené produkty byly v poměru 63/10 (N^7/N^9) a konverze výchozí látky byla pouze 7 %. Vyplývající závěr je ten, že ani metoda přímé alkylace za použití Grignardových činidel není dostačující pro získání požadovaného produktu.

3.1.2 Aplikace silylační metody

Jak již bylo uvedeno v charakteristice silylační metody, tato metoda se obecně používá pro přípravu purinových a pyrimidinových nukleosidů. Pomocí silylační metody je

v chemii purinů možné připravit hlavně N^9 izomery. Na druhou stranu jsou známé také reakce, kde očekávaná regioselektivita za vzniku N^9 izomeru klesá, nebo je dokonce výrazně posunuta ve prospěch tvorby N^7 izomeru. Pro zavádění *terc*-butylové skupiny se stala inspirací Vorbrüggenova metoda, která byla již částečně prozkoumána a propracována u 6-chlorpurinu v závěrečné práci Bc. Filipa Nevrlky.⁶⁰ V této práci budou aplikovány dříve nabyté poznatky s vlastními inovacemi pro zavádění *terc*-butylu u 2,6-dichlorpurinu.

3.1.2.1 Optimalizace silylační metody

Za původně aplikovaných podmínek reakce reagovalo nejprve analytické množství 0,25 mmol 2,6-dichlorpurinu v inertní atmosféře argonu a 2 ml DCE s 1,5 eq. BSA při 75–80 °C po dobu 30 minut. V dalším kroku byla reakční směs ochlazená na 0 °C, bylo přidáno 2,1 eq. SnCl_4 . Reakční směs se nechala vytemperovat během 15 minut na laboratorní teplotu. Ihned po vytemperování byly přidány 3 eq. *terc*-butylbromidu a reakce následně probíhala za laboratorní teploty. Reakce byla monitorována pomocí LC/MS po 25 a 46 hodinách a poté po 7 dnech. Během reakce se postupně sice tvořil požadovaný N^7 (**2**) izomer, ale v s nízkou konverzí a ani časové hledisko nebylo ideální. Bylo tedy nutné optimalizovat reakční podmínky ve snaze zvýšit konverzi výchozí látky a ovlivnit tak později i výtěžnost (Tabulka 1).

Tabulka 1: Optimalizace reakčních podmínek

šarže	rozpouštědlo	SnCl ₄	<i>t</i> -BuBr	teplota	reakční čas	poměr látek (1)/(2)/(3)
1 (původní)	DCE	2,1 eq.	1,5 eq.	RT	25 h	10/2/0
					46 h	10/3/0
					7 dní	10/3/0
2	DCE	2,1 eq.	3 eq.	0 °C	2 h	10/2/0
					24 h	10/6/0
					46 h	10/14/0
					7 dní	10/15/0
					9 dní	10/6/0
3	DCE	2,1 eq.	3 eq.	50 °C	24 h	10/29/27
					46 h	10/32/54
					7 dní	10/17/81
					9 dní	10/13/78
4	ACN	2,1 eq.	3 eq.	RT	2 h	10/68/43
					24 h	10/424/28
					6 dní	10/162/24
5	ACN	2,1 eq.	3 eq.	50 °C	2 h	10/65/42
					24 h	10/4/38
					6 dní	10/2/67
6	ACN	2,1 eq.	3 eq.	0 °C	1 h	10/15/0
					2 h	10/25/0
					3 h	10/50/0
7	ACN	2,1 eq.	3 eq.	80 °C	3 h	10/0/69

Hodnoty z LC/MS analýz

U všech prováděných optimalizačních reakcí bylo v prvním kroku použito 1,5 ekvivalentu BSA, se kterým 2,6-dichlorpurin reagoval při 75–80 °C po dobu 30 minut. Na základě optimalizační tabulky 1 v rámci zahrnutí všech reakčních faktorů byly z prováděných experimentů na závěr vyhodnoceny jako optimální šarže 6 a 7 s tím, že reakční doba obou jsou 3 hodiny, kdy došlo k nejlepší konverzi výchozí látky a zároveň

nedošlo k téměř žádné a současně významné tvorbě nežádoucích jiných izomerů v reakční směsi. Obě šarže 6 a 7 jsou prováděny v acetonitrilu s 3 ekvivalenty *tert*-butylbromidu za přítomnosti 2,1 ekvivalentů Lewisovy kyseliny SnCl₄ jako nezbytného katalyzátoru. Reakce přípravy látek (2) a (3) zobrazuje schéma 19.

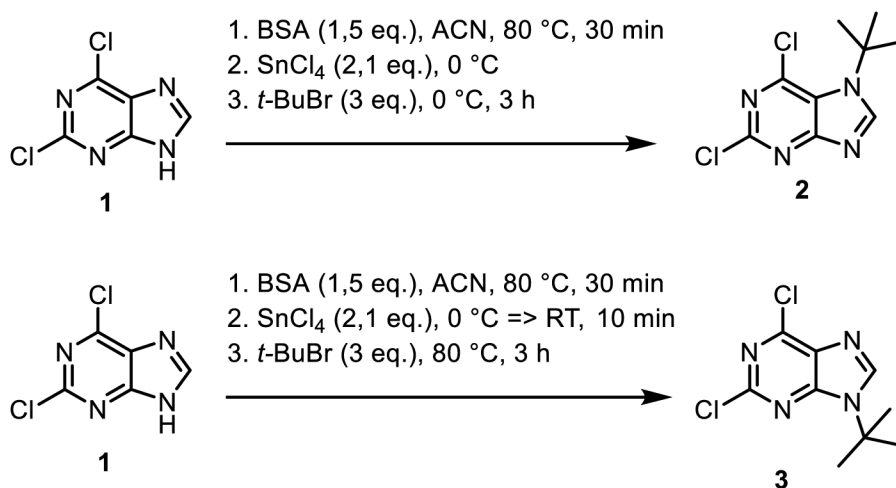


Schéma 19: Optimalizovaný postup přípravy *tert*-butylovaných prekurzorů

Od šarže 2 byly už vždy používány 3 ekvivalenty *tert*-butylbromidu, protože jeho větší množství oproti šarži 1 zlepšilo konverzi výchozí látky na produkt, kterým byl zde *N*⁷ izomer. Teplotní rozdíl a různá reakční doba v šaržích 2 a 3 rovněž poukázaly na posuny v konverzi a zároveň podpořily odlišnou regioselektivitu pro přípravu kineticky stabilního *N*⁷ izomeru a termodynamicky stabilního *N*⁹ izomeru. Z pohledu nízké konverze zejména pro šarži 2 a dále pro obě šarže 2 a 3 pak z hlediska příliš dlouhého reakčního času bylo zapotřebí tento problém vyřešit, a proto byl 1,2-dichlorethan jako rozpouštědlo zaměněn za acetonitril, u kterého se předpokládal kratší reakční čas pro provádění reakce. Jak lze vidět z šarží 4 a 5, tak acetonitril skutečně výrazně zvýšil konverzi výchozí látky směrem k produktům a spolu s tím také zkrátil reakční dobu. To by však samo o sobě nestačilo. Poslední překážkou bylo vykorigovat jednoznačnou regioselektivitu a s ní spojenou teplotu a reakční dobu, aby vznikal samostatně jeden či druhý izomer. U předchozích zmíněných šarží si lze povšimnout, že regioselektivní tvorba kineticky stabilního *N*⁷ izomeru bez vzniku ostatních izomerů je značně podpořena při teplotě 0 °C, z toho důvodu byla zahájena šarže 6, která byla pečlivě co hodinu monitorována přes LC/MS. Po 3 hodinách byla reakce zanalyzována a ukončena, protože se na záznamu z chromatogramu začaly objevovat náznaky nežádoucích izomerů. Cílený *N*⁷ produkt byl tedy za daných podmínek získán s konverzí v poměru 10/50 (1/2). Na

základě toho, že byl N^7 izomer při svých podmínkách optimálně připraven za dobu 3 hodin, byla stejná reakční doba aplikována pro přípravu i N^9 izomeru a navíc byla reakční teplota zvýšena z 50 °C na 80 °C. Tato teplota byla zvolena jako teplota blízká bodu varu acetonitrilu a rovněž z důvodu podpoření termodynamické rovnováhy pro vznik N^9 izomeru, o němž jak už bylo dříve řečeno, je stabilní termodynamicky. Shodou okolností se po LC/MS analýze 3 hodiny pro přípravu N^9 izomeru jeví jako velmi dobré. Postupem pro šarži 7 je možné výsledný produkt obdržet s konverzí 10/69 (1/3). Dále také nedochází k tvorbě jiných izomerů.

Takto připravené produkty podle šarží 6 a 7, tedy 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin a 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin, byly dále zpracovány extrakčním procesem. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol, aby zreagoval s nadbytečným SnCl_4 . Poté byl každý produkt původně extrahován v systémech chloroform a destilovaná voda a chloroform a hydrogenuhličitan sodný. Nakonec došlo k promytí směsi solankou a bylo zkontrolováno pH, aby nebylo příliš kyselé, což by mělo opět špatný vliv na stabilitu zejména N^7 produktu. Po analýze surového produktu na LC/MS bylo zjištěno, že opakovanou extrakcí ve zmiňovaných systémech se dá velmi dobře zbavit případně zcela minoritních nežádoucích izomerů a hlavně také výchozí látky. Záznamu z chromatogramu však odhalil dva píky neznámých nečistot a analýza za pomoci TLC tento objev potvrdila. Při reprodukci celého postupu byl v průběhu extrakce vynechán krok s hydrogenuhličitanem sodným a po opětovné TLC analýze se již tyto nečistoty na nosné destičce neobjevily. Daných nečistot se podařilo zbavit také po rekrystalizaci produktu v isopropanolu, ale pro jejich účinnější odstranění byl výsledně zvolen postup, kdy je extrakce prováděna jen v systému chloroform a destilovaná voda následovaná promýváním solankou.

Celá příprava obou *tert*-butylovaných prekurzorů byla provedena pro ověření reakce ze čtyřnásobného množství reakčních komponent. Při sledování průběhu reakcí se potvrdilo, že metoda přípravy za použití silylace probíhá beze změn jako s analytickým množstvím. Oba izomery (2) a (3) měly podle kontroly v $^1\text{H-NMR}$ spektru vysokou čistotu i v surovém stavu, kdy výtěžky činily 84 % pro (2) a 79 % pro (3). Dále byly reakce znovu ověřeny, když byly zahájeny z 1 g 2,6-dichlorpurinu a protože bylo zapotřebí více než získané množství *tert*-butylovaných prekurzorů při reakci z 1 gramu výchozí látky, bylo provedeno ještě další navýšení, kdy se začínalo z 5 g 2,6-dichlorpurinu. Tedy ve všech případech týkajících se navýšení, reakce probíhala úspěšně tak, jak se po optimalizaci

zamýšlelo. Výsledné produkty byly při finální přípravě na veliko po rekrystalizaci z IPA izolovány ve výtěžku 61 % pro 7-(*terc*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) a 57 % pro 9-(*terc*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**3**), což víceméně odpovídá výtěžkům produktů vycházejících z 1 g výchozí látky, a tedy 60 % pro N^7 izomer a 57 % pro N^9 izomer.

3.1.2.2 Aplikace jiných Lewisových kyselin

Lewisových kyselin existuje celá řada. Pro silylační metodu se dle Vorbrüggenovy modifikace nejčastěji používají $TiCl_4$, $SnCl_4$ a TMSOTf. Tyto látky mají ve zmíněné metodě funkci katalyzátoru. Protože celá zoptimalizovaná příprava *terc*-butylovaných prekurzorů probíhá v přítomnosti katalyzátoru $SnCl_4$, bylo zajímavé vyzkoušet i jiný a sledovat, jak a zda bude ovlivňovat průběh reakcí. Pro tyto účely byl vybrán TMSOTf. Reakce byla prováděna standardním optimalizovaným postupem pro oba izomery v analytickém množství, tedy pro 0,25 mmol 2,6-dichlorpurinu (Schéma 20). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Reakce s TMSOTf

šarže	teplota	Reakční čas	Poměr látek (1)/(2)/(3)
1	0 °C	3 h	bez reakce
2	0 °C	27 h	pouze tvorba aduktu
3	80 °C	3 h	10/0/21
4	80 °C	27 h	10/0/1064 s tvorbou aduktu

Hodnoty z LC/MS analýz

Z tabulky 2 jde vidět, že reakce zamýšlené pro přípravu N^7 izomeru vůbec neproběhly. V šarži 2, u které se pokračovalo od 3 hodin dál, se naopak vytvořil neznámý adukt. Co se týče reakcí směřovaných k N^9 izomeru, byly 3 hodiny nedostatečné z hlediska konverze výchozí látky, a proto byla reakční doba prodloužena na 27 hodin. Tehdy byla konverze prakticky kvantitativní, ovšem došlo v malé míře k tvorbě neznámého aduktu. Závěr tohoto experimentu je takový, že TMSOTf není vhodným katalyzátorem zkoumané reakce. Navíc jeho použití vede pouze ke tvorbě N^9 izomeru.

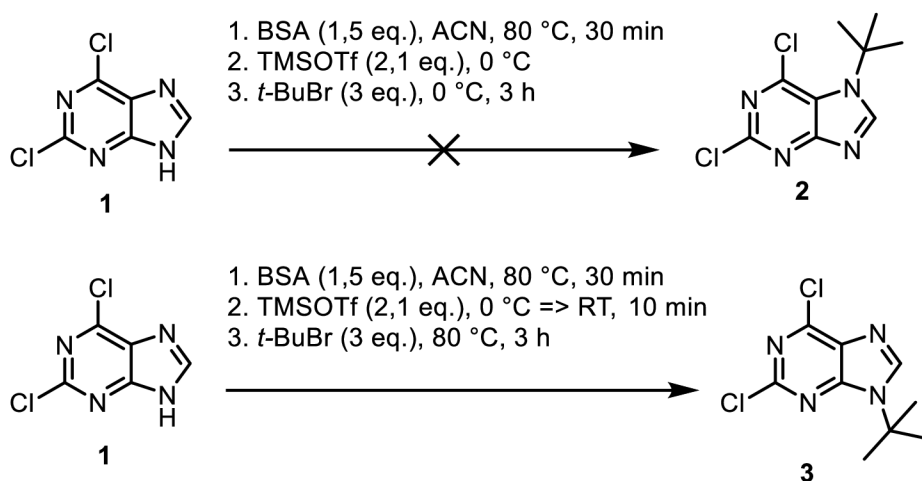


Schéma 20: Optimalizovaný postup přípravy *tert*-butylovaných prekurzorů za použití TMSOTf

3.1.2.3 Náhrada *tert*-butylbromidu za *tert*-butylacetát

Tert-butylbromid rozhodně není jediným substrátem pro zavedení *tert*-butylového zbytku, tudíž bylo také důležité a zajímavé nahradit toxický *tert*-butylbromid a vyzkoušet místo něj jiné činidlo. Pro takovouto reakci se vhodně nabízel *tert*-butylacetát. Orientační reakce byly prováděny standardním postupem pro oba izomery z analytického množství (Schéma 21). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

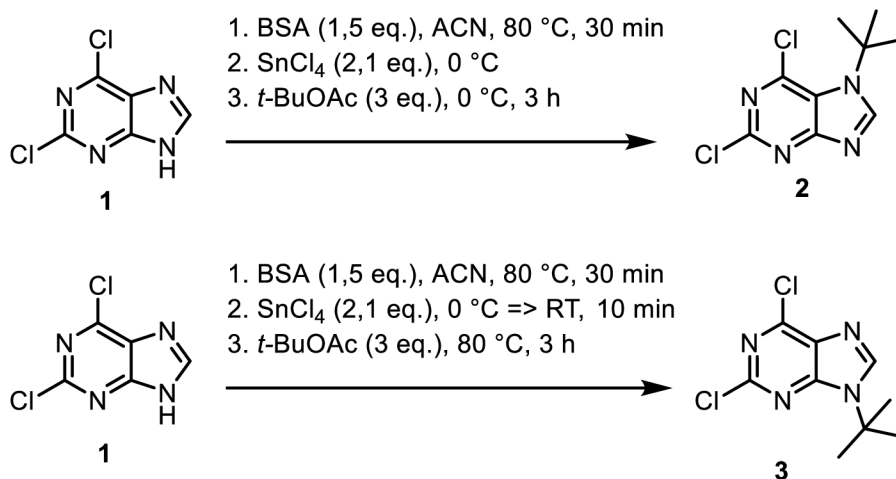


Schéma 21: Optimalizovaný postup přípravy *tert*-butylovaných prekurzorů za použití *t*-BuOAc

Tabulka 3: Reakce s *terc*-butylacetátem

šarže	teplota	reakční čas	poměr látek (1)/(2)/(3)	poměr produkt (2)/ jiný izomer
1	0 °C	3 h	10/58/0 s tvorbou jiného izomeru	45/10
2	0 °C	5 h	10/109/0 s tvorbou jiného izomeru	30/10
3	0 °C	23 h	10/182/0 s tvorbou jiného izomeru	21/10
4	80 °C	3 h	10/0/32	-
5	80 °C	4 h	10/0/40	-
6	80 °C	5 h	10/0/50	-
7	80 °C	6 h	10/0/62	-
8	80 °C	7 h	10/0/83	-

Hodnoty z LC/MS analýz

Z naměřených hodnot z tabulky 3 vyplývá, že v případě reakcí pro N^7 izomer je standardní tříhodinový postup v šarži 1 už mírně nevyhovující z důvodu tvorby dalšího nežádoucího izomeru. Reakce probíhala dál v šaržích 2 a 3 s otázkou, zda dojde k lepší konverzi, což se skutečně stalo, bohužel tím ale také přibýval nechtěný jiný izomer. U N^9 izomeru bylo zjištěno, že tříhodinová reakce v šarži 4 probíhá bez problému s předpokládaným průběhem, pouze konverze je oproti reakci za použití *terc*-butylbromidu zhruba poloviční. Z toho důvodu byl reakce ponechán delší reakční čas, aby bylo možné usoudit, co se poté stane s konverzí. Výsledek nebyl překvapivý, protože v šaržích 5 až 8 konverze postupně rostla. Ve srovnání šarží 1 a 4 se standardním postupem je použití *terc*-butylbromidu lepší v případě N^7 izomeru s ohledem na minimální tvorbu nežádoucích jiných izomerů v reakční směsi a v případě N^9 izomeru zase z hlediska vyšší konverze výchozí látky na požadovaný produkt. Reakce z pohledu zjednodušení byla standardním způsobem pro ověření průběhu a preparativní účely zopakována ve čtyřnásobném množství v případě obou izomerů. Po zpracování, kterým

se účinně podařilo odstranit nechtěné izomery, byl 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) v surovém stavu obdržen s výtěžkem 64 % a záznam z chromatogramu obsahoval pouze jeho pik, zatímco 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**3**) byl rovněž v surovém stavu získán s výtěžkem 80 %, ale při analýze jeho spektra z LC/MS se na záznamu objevily v menší míře nežádoucí nečistoty, které by bylo nejspíš možné odstranit rekrystalizací. Obecně se však dá říct, že *tert*-butylacetát je možné použít jako činidlo pro zavedení *tert*-butylové skupiny tímto způsobem na purinový skelet jak do polohy N^7 , tak polohy N^9 . Ovšem *tert*-butylbromid je vhodnější, protože s ním probíhají reakce rychleji, co se týče N^9 izomeru a v případě N^7 izomeru dochází ke vzniku podstatně menšího podílu jiných izomerů.

3.1.2.4 Aplikace silylační metody na reakce s jinými halogenderiváty

Bylo také zajímavé vyzkoušet, zda bude mít silylační metoda širší použití, a proto byla aplikována i na jiné uhlovodíkové zbytky jako jsou primární a sekundární alkyly. K tomu sloužila série různých halogenderivátů. *Tert*-butylchlorid sloužil jako analog pro srovnání s *tert*-butylbromidem. Jak reakce za použití standardního postupu pro N^7 a N^9 deriváty probíhaly (Schéma 22) je znázorněno v tabulce 4.

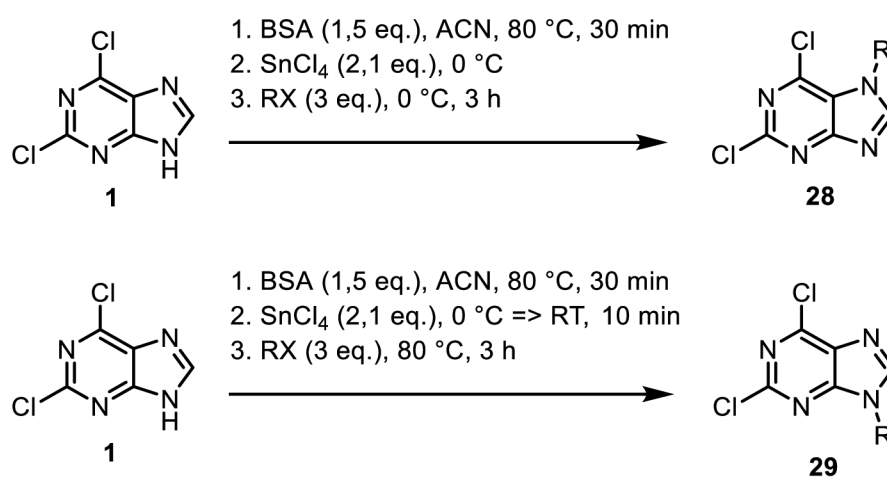


Schéma 22: Reakce s jinými halogenderiváty

Tabulka 4: Průběh reakce s jinými halogenderiváty

alkylační činidlo R-X	výchozí l. (1)/ N^7 produkt (28)	výchozí l. (1)/ N^9 produkt (29)
<i>tert</i>-butylchlorid	10/20	10/94
benzylbromid	10/9	10/0,2 tvorba složité směsi
allylbromid	bez reakce	10/0,7
brombenzen	bez reakce	bez reakce
2-brompropan	bez reakce	10/0,2
1-brompropan	bez reakce	bez reakce
bromethan	bez reakce	bez reakce
jodmethan	bez reakce	10/0,1

Hodnoty z LC/MS analýz

Z tabulky 4 zcela patrné, že reakce, které by měly vést k N^7 derivátům, neposkytují žádnou reakci kromě případů *tert*-butylchloridu a benzylbromidu. V případě N^9 derivátů alespoň nějaká reakce vedoucí k požadovaným produktům probíhá, a to při použití benzylbromidu, allylbromidu, 2-brompropanu a jodmethanu. Bohužel ale u všech čtyř jmenovaných s mizivou konverzí. Reakce s benzylbromidem má navíc příliš reaktivní průběh, kde se tvoří spousta neznámých produktů. Jediným halogenderivátem, který obstojně reagoval v obou případech, tak byl *tert*-butylchlorid, u nějž byl podobný průběh předpokládán. Pro tvorbu N^7 izomeru byl horším alkylačním činidlem, ale pro tvorbu N^9 izomeru zase lepším z hlediska konverze než *tert*-butylbromid.

Na základě tohoto experimentu s jinými halogenderiváty se silylační metoda jeví jako nevhodná pro zavádění primárních a sekundárních alkylů, ale na druhou stranu je zřejmě selektivní pro zavádění terciárních zbytků. Použití dalšího alkylačního činidla v podobě 2-brom-2-methylbutanu sloužilo k ověření zmíněného předpokladu. Znovu byl použit standardní postup bez další optimalizace (Schéma 23), a protože bylo v zájmu produkty získat a zpracovat, byla reakce zahájena rovnou ze čtyřnásobku.

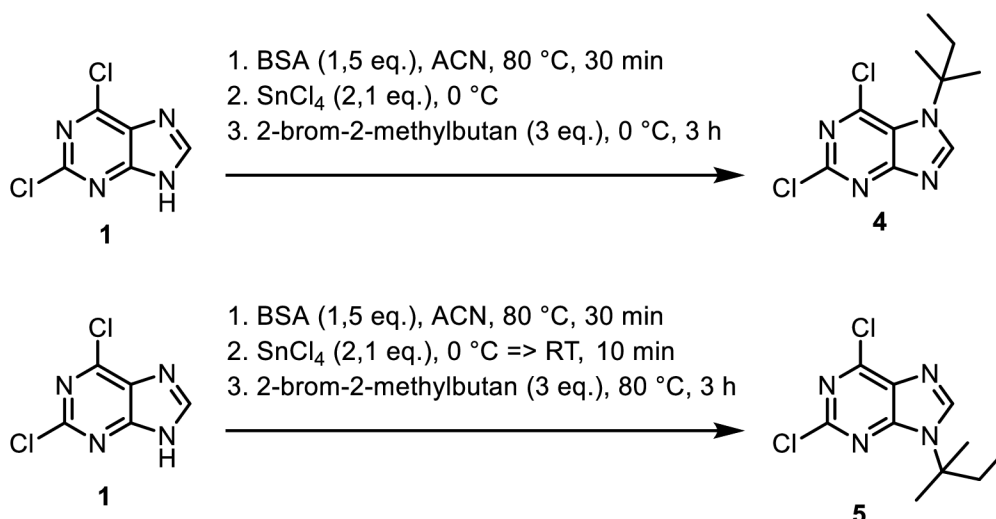


Schéma 23: Příprava N^7 a N^9 izomeru za použití 2-brom-2-methylbutanu

Produkty byly svými postupy připraveny regioselektivně. 2,6-Dichlor-7-(*tert*-pentyl)purin (**4**) byl obdržen v reakční směsi s konverzí 10/13 (**1/4**) a po zpracování a čištění ve výtěžku 44 %. 2,6-Dichlor-9-(*tert*-pentyl)purin (**5**) vykazoval v reakci konverzi 10/39 (**1/5**). Finální výtěžek činil 60 %. Zavádění *tert*-pentylu pomocí 2-brom-2-methylbutanu podporuje aplikovatelnost vyvinuté silylační metody pro terciární zbytky na rozdíl od zavádění primárních a sekundárních.

3.2 Zkouška stability připravených *tert*-butylovaných prekurzorů

V této kapitole bude blíže popsána stabilita *tert*-butylovaných prekurzorů, o níž byla prozatím letmá zmínka v kapitole 3.1.2.1. Vzhledem k plánovaným modifikacím atomů chloru na purinovém skeletu potřebným k pozdější přípravě analogů purinových inhibitorů CDK, bylo nutné otestovat stabilitu navázaného *tert*-butylu za různých podmínek. Existuje zde totiž obava, že připravené prekurzory mohou být z pohledu zachování struktury nestabilní a může dojít k odštěpení *tert*-butylového zbytku. Zejména pokud jde o N^7 izomer, lze očekávat tuto sníženou stabilitu. Stabilita byla ozkoušena vlivem kyselce a bazicky působících látek.

3.2.1 Zkouška kyselé a alkalické stability

Tert-butylované N^7 a N^9 izomery (**2**) a (**3**) byly podrobeny zkoušce stability *tert*-butylového postranního řetězce v závislosti na aciditě prostředí. Testy byly prováděny v případě kyselého prostředí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (1:20) při 100 °C

(10 mg/ml) a naproti tomu zkouška stability v bazickém prostředí byla prováděna v 1 ml roztoku hydroxidu sodného obsahujícího 3 ekvivalenty hydroxidu oproti množství *tert*-butylovaných prekurzorů také při 100 °C (10 mg/ml). Reakce probíhaly 30 minut (Schéma 24).

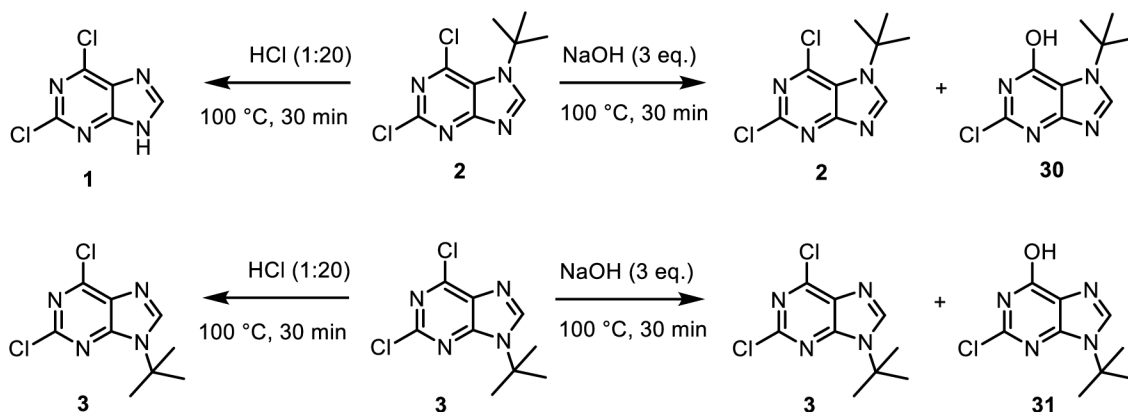


Schéma 24: Zkouška stability v kyselém a zásaditém prostředí

Po zanalyzování bylo u 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**2**) zjištěno, že již po půlhodině v kyselém prostředí *tert*-butyl zcela odpadne, tudíž pro něj není kyselé prostředí vhodné. V bazickém prostředí naopak *tert*-butyl odolal a začalo docházet i k substituci chloru v poloze 6 za OH- skupinu. 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**3**) byl stabilní v obou prostředích a stejně jako u předchozího izomeru docházelo k substituci chloru v poloze 6 za OH- skupinu.

3.2.2 Zkouška stability vlivem Lewisovy kyseliny SnCl₄

Nejprve byla tato zkouška prováděna pro oba prekurzory za inertních podmínek, aby se prokázal kyselý vliv SnCl₄ na nestabilitu *tert*-butylu. Reakce probíhaly v acetonitrilu při 80 °C po dobu jedné hodiny. Množství přidaného SnCl₄ činilo jeden ekvivalent vůči *tert*-butylovanému prekurzoru (Schéma 25).

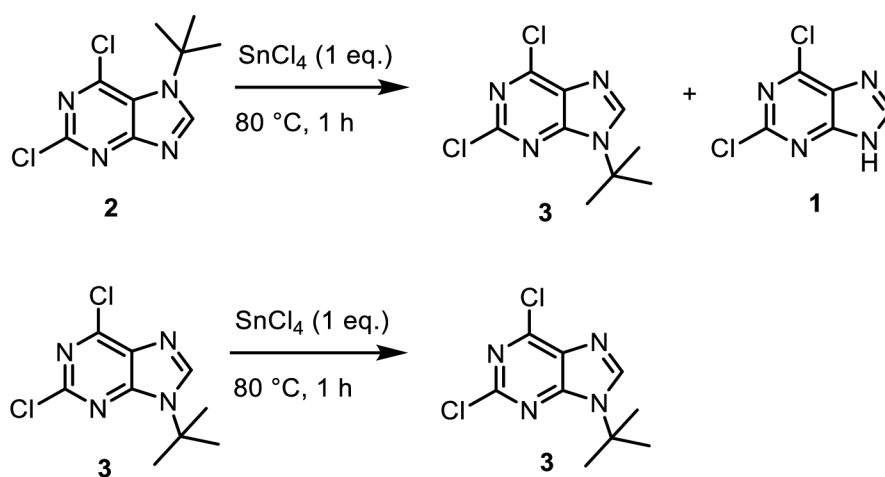


Schéma 25: Zkouška stability izomerů N^7 a N^9 v přítomnosti SnCl_4

Na základě analýzy bylo zjištěno, že 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**3**) byl v přítomnosti použité Lewisovy kyseliny zcela stabilní. 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) opět potvrdil svou nestabilitu i v tomto případě, kde po proběhnutí reakce vznikla směs dvou látek, a tedy 2,6-dichlorpurinu (**1**) a 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**3**), který vznikl izomerací, ve vzájemném poměru 3/10 (**3/1**).

Dále byl test stability s SnCl_4 proveden pouze pro N^7 izomer v rozdílných rozpouštědlech za inertních podmínek. Byly zahájeny čtyři reakce, kdy 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) reagoval s 0,5 a 2 ekvivalenty SnCl_4 buď v 1,2-dichlorethanu, nebo acetonitrilu. Opět reakce probíhaly po dobu jedné hodiny při 80 °C. Výsledky ohledně průběhu reakcí jsou v tabulce 5.

Tabulka 5: Zkouška stability N^7 izomeru v přítomnosti SnCl_4 v DCE a ACN

šarže	rozpuštědlo	množství SnCl_4	poměr látek (1)/(2)/(3)
1	DCE	0,5 eq.	10/346/0
2	DCE	2 eq.	10/13/2
3	ACN	0,5 eq.	10/0/4
4	ACN	2 eq.	10/0/2

Hodnoty z LC/MS analýz

Zvyšující se množství katalyzátoru ovlivňuje nepříznivě stabilitu sledované látky ve všech šaržích. Lze si povšimnout, že za použití DCE jako rozpouštědla je přechod zpět na výchozí látku značně pomalejší, než je tomu u reakcí s ACN. Během tohoto přechodu

se nejprve N^7 izomer mění na N^9 izomer. U šarží 3 a 4 za účasti ACN vyplývá závěr, že toto rozpouštědlo má spolu s SnCl_4 vliv na nestabilitu 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurinu (**2**) a také výrazně urychluje změnu z N^7 na N^9 izomer (**3**). Takže celkově je z pohledu stability výhodnější společně s SnCl_4 DCE, ale zpětně v rámci přípravy *tert*-butylovaných prekurzorů je stejně lepší ACN, protože reakce netrvá tak dlouho a je dosaženo velmi příznivých výtěžků. Když se připravený N^7 *tert*-butylovaný prekurzor přednostně včas a vhodně zpracuje, dá se jeho nestabilitě obratně předejít.

3.3 Studium struktury připravených prekurzorů

Silylační metodou byly ve velmi dobrém výtěžku připraveny dva *tert*-butyl-2,6-dichlorpuriny lišící se pozicí navázaného alkyly. Z toho důvodu bylo potřeba přesně specifikovat, který izomer je který. Pro jasné určení struktury byly použity čtyři způsoby.

První a nejjednodušší cestou je srovnání hodnot na základě fyzikálních a spektrálních dat s již popsanými stejnými sloučeninami v literatuře³⁸. Proto byla porovnána naměřená data z ^1H NMR, která odpovídala pro oba prekurzory s pouhým rozdílem v setinách ppm. Dále byly také srovnány hodnoty teplot tání. Zde se bohužel naměřené hodnoty s odkazovanou literaturou mírně liší. Pro N^7 (**2**) izomer byla změřena teplota tání na 193–195 °C a literatura uvádí 200–205 °C, u N^9 (**3**) izomeru je naměřená hodnota 181–182 °C a v literatuře se setkáme s hodnotou 175–180 °C. Naproti tomu hodnota teploty tání pro 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) se shoduje s naměřenými hodnotami v bakalářské práci Bc. Filipa Nevrlky⁶⁰. Pomocí HRMS byla stanovena přesná molekulová hmotnost ($(\text{M}+1)^+$ 245,0364) pro N^7 a ($(\text{M}+1)^+$ 245,0357) pro N^9 izomer (**3**). Vygenerovaný sumární vzorec byl v obou případech ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4$).

Druhý způsob ověření polohy *tert*-butylové skupiny je porovnání chemického posunu v ^{13}C NMR spektru na uhlíku C^5 . U N^7 izomeru by to mělo být okolo hodnoty 122 ppm, což je v souladu s naměřenou hodnotou 122,4 ppm. V případě N^9 izomeru by to zase mělo být okolo hodnoty 132 ppm a opět naměřená hodnota 131,9 ppm spolehlivě koreluje. Tyto hodnoty jsou pro 6, chlorpurinové izomery N^7 a N^9 typické.⁵⁹

Třetí možností je spočítat rozdíl chemických posunů mezi C^5 a C^8 , který je u N^7 izomerů zhruba mezi 23–27 ppm a u N^9 izomerů mezi 11–14 ppm. Každopádně co se týče N^7 izomerů měl by být tento rozdíl vyšší. Pro připravený 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin je

rozdíl chemických posunů těchto uhlíků $\Delta\delta = 21,2$ a pro 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin je $\Delta\delta = 11,7$ ppm.⁵⁹

Čtvrtou metodou je derivatizace *tert*-butylovaných prekurzorů na methoxy derivát, kdy bude methoxy skupina navázaná místo chloru v poloze 6 (Schéma 26). Určování struktury se provádí pomocí NOESY experimentu, kde by spolu přes prostor měly interagovat vodíky na methoxy skupině s vodíky na *tert*-butylové skupině. Měření NOESY bylo na příslušných derivátech provedeno a skutečně se zmiňovaná interakce potvrdila u *N*⁷ derivátu (**17**), viz. Přílohy.

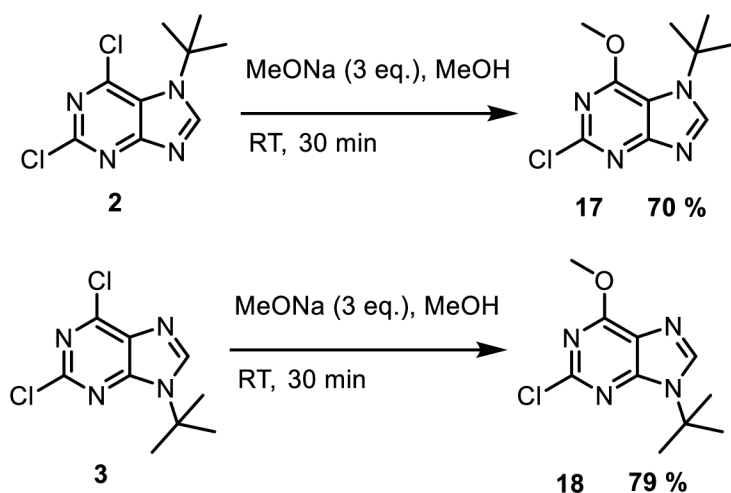


Schéma 26: Příprava methoxy derivátů

Na základě všech měření a porovnávání hodnot byl jednoznačně identifikován 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**2**) a 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlorpurin (**3**).

3.4 Příprava *tert*-butylovaných analogů inhibitorů CDK

Tato kapitola se zabývá problematikou postupných substitučních reakcí vedoucích až k finálním produktům. Kapitola je rozdělena především do dvou úseků reprezentujících jednotlivé substituční kroky, kdy dochází k náhradě atomů chloru na struktuře *tert*-butylovaných prekurzorů (**2**) a (**3**).

3.4.1 Reakce *N*⁷ a *N*⁹ *tert*-butylovaných prekurzorů s benzylaminem

Aby bylo možné připravit strukturně podobné analogy inhibitorů CDK, musí být do polohy 6 purinového skeletu umístěn benzylaminový postranní řetězec. Při této syntéze se využívá vyšší reaktivity atomu chloru v poloze 6, kam by se jinak vázal i jiný zbytek, a tudíž je nezbytné tímto krokem za použití benzylaminu začít. Pro přípravu

požadovaných meziproductů (6) a (7) byl aplikován obecný postup pro zavádění benzylaminu. Pro ověření reakce reagovalo nejdříve analytické množství N^7 a N^9 *tert*-butylovaných výchozích látek (2) a (3), představující 50 mg látky, se 2 ekvivalenty DIPEA a 1,5 ekvivalenty benzylaminu v *n*-butanolu jako rozpouštědle za inertních podmínek při 110 °C (Schéma 27). Výsledky uvádí tabulka 6.

Tabulka 6: Reakce N^7 a N^9 *tert*-butylovaných prekurzorů s benzylaminem

výchozí látka	reakční čas	poměr výchozí látka/produkt
N^7 (2)	1 h	10/99
N^7 (2)	3 h	úplná konverze
N^9 (3)	1 h	úplná konverze
N^9 (3)	3 h	úplná konverze

Hodnoty z LC/MS analýz

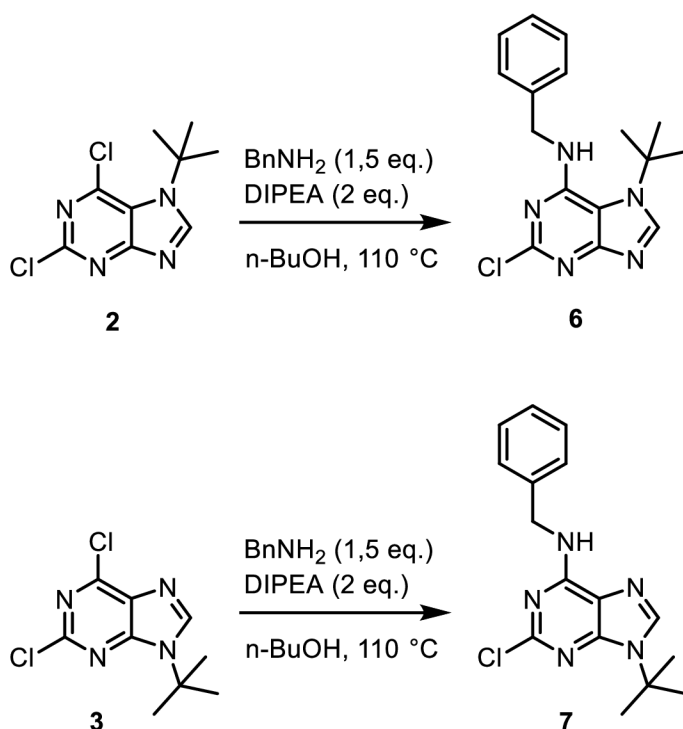


Schéma 27: Reakce s benzylaminem

Díky těmto příznivým výsledkům byla reakce zahájena znovu, a to přímo z 1 g výchozích látek. Reakce byly následně na LC/MS monitorovány po dvou hodinách, za účelem jistoty v konverzi výchozí látky na produkt v případě obou izomerů. Pro N^9 derivát (6) se tento postup stal zcela dostatečným. U N^7 derivátu 7 byla prodloužena reakční doba na 3 hodiny

kvůli reziduální výchozí látce, došlo však k překvapivému objevu, že ve směsi výchozí látka stále zůstává i po třech hodinách jen s lepší konverzí, která byla 10/151 (**2/6**). Další opakování této reakce dopadly vždy stejně, což je v rozporu s prvotním testem, ovšem výchozí látky se dá efektivně zbavit extrakcí, nebo jak bylo později zjištěno, kdy se v roztoku samovolně tvořila sraženina produktu, i samotným přefiltrováním a promytím. Reakční doba N^7 izomeru byla stanovena na 3 hodiny. Výsledné meziproducty *N*-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) a *N*-Benzyl-9-(*tert*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**) byly získány, postupem zahrnujícím při zpracování pouze filtraci a promývání, ve vysoké čistotě s výtěžkem 69 % (**6**) a 72 % (**7**).

3.4.2 Příprava finálních N^9 produktů (**10**), (**13**) a (**15**)

Druhým krokem vedoucím k přípravě daného analogu inhibitoru CDK, je substituce atomu chloru v poloze 2 s příslušným aminoalkoholem. Za tímto účelem byl aplikován obecný postup přípravy pro zavedení aminoalkoholů na purinový skelet do polohy 2.⁶¹ V prvotních screeningových reakcích pro přípravu analogů olomoucínu I (**10**) a bohemninu (**13**) bylo použito 60 mg N^9 benzylaminového derivátu **7** reagujících s 8 ekvivalenty aminoalkoholu, kterými byly 2-aminoethan-1-ol a 3-aminopropan-1-ol, při 150 °C za inertních podmínek (Schéma 28).

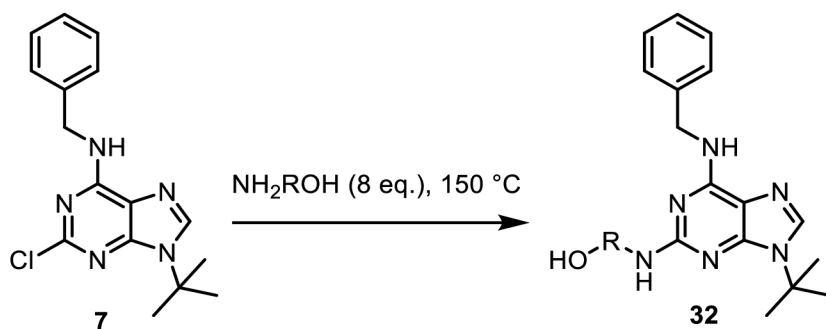


Schéma 28: Reakce N^9 derivátu (**7**) s aminoalkoholy

Z důvodu ne zcela úplné konverze a také za preparativními účely byly reakce reprodukovány se 100 mg výchozí látky a postupným monitorováním byly reakce zastaveny po třech hodinách. Analog olomoucínu I (**10**) byl připraven s konverzí 10/401 (**6/10**) a dále byl čištěn sloupcovou chromatografií s výtěžkem 72 %. Analog bohemninu (**13**) byl připraven s konverzí 10/192 (**7/13**). Protože se v $^1\text{H-NMR}$ spektru analogu olomoucínu I vyskytovaly v menší míře nečistoty a reakci analogu bohemninu bylo potřeba provést ještě jednou pro ověření, zda opravdu takto probíhá, byla zahájena další

šarže trvající 3 hodiny, kdy najednou došlo k úplné konverzi na produkt v obou případech. Analog olomoucínu I byl dokonce po této reakci čištěn rekrystalizací s výtěžkem 35 %. Analog boheminu byl čištěn sloupcovou chromatografií s výtěžkem 74 %.

Tyto výsledky posloužily jako základ pro přípravu analogu roscovitinu (**15**), kdy s výchozí látkou reagovalo 8 ekvivalentů (*R*)-2-aminobutan-1-olu při 150 °C za inertních podmínek. Reakce probíhala nejprve 3 hodiny, avšak konverze byla příliš malá, a proto byla s rostoucím reakčním časem reakce monitorována. K úplné konverzi došlo po 30 hodinách a výsledný produkt byl po čištění rekrystalizací obdržen ve výtěžku 58 %.

Reakce vedoucí k přípravě *N*⁹ *tert*-butylovaných purinových analogů inhibitorů CDK olomoucínu I (**10**), boheminu (**13**) a roscovitinu (**15**) shrnuje schéma 29.

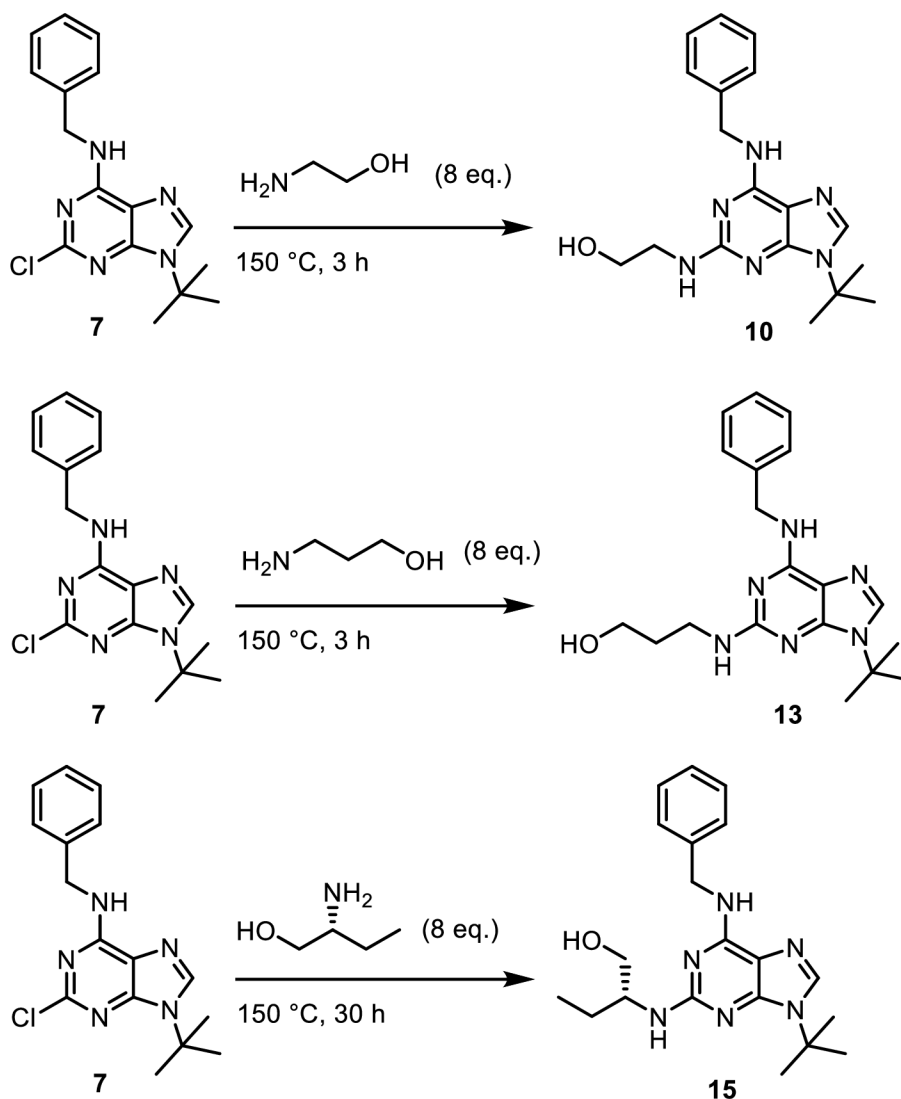


Schéma 29: Přípravy *N*⁹ *tert*-butylovaných analogů olomoucínu I, boheminu a roscovitinu

3.4.3 Příprava finálních N^7 produktů (8), (11) a (14)

I v tomto případě byl použit stejný postup pro substituci atomu chloru v poloze 2 jako u N^9 analogů. Reakce pro přípravu analogu boheminu (11) byla zahájena zcela analogicky, jen teplota byla 160 °C. Na záznamu z chromatogramu jde vidět, že došlo k úplné konverzi výchozí látky a že spektru naprosto predominuje jeden pík. Tento pík měl ovšem molekulovou hmotnost o 10 jednotek nižší, než by správně měl mít kýžený produkt. Reakce byla provedena znovu a také při 150 °C jak pro analog boheminu (11), tak olomoucínu I (8). Už po 10 minutách došlo ve všech případech k tvorbě onoho píku spolu s produkty. S rostoucí reakční dobou se množství tohoto nežádoucího vedlejšího produktu v prováděných reakcích zvyšovalo. Jak bylo později zjištěno, pík s molekulovou hmotností o 10 jednotek nižší odpovídá struktuře, u které dochází o otevření imidazolového kruhu a současně k odštěpení uhlíku C^8 purinového skeletu (Schéma 30). Chybějící atom uhlíku u obou sloučenin byl dokázán v ^{13}C -NMR spektrech. Určitá nesrovnalost byla v 1H -NMR spektrech, kdy chyběly záznamy vodíků na pozicích 4 a 5, které jsou pravděpodobně součástí širokých signálů. Syntéza N^7 analogů purinových inhibitorů CDK se musela s tímto zásadním problémem vypořádat a bylo nutné jej alespoň co nejvíce eliminovat.

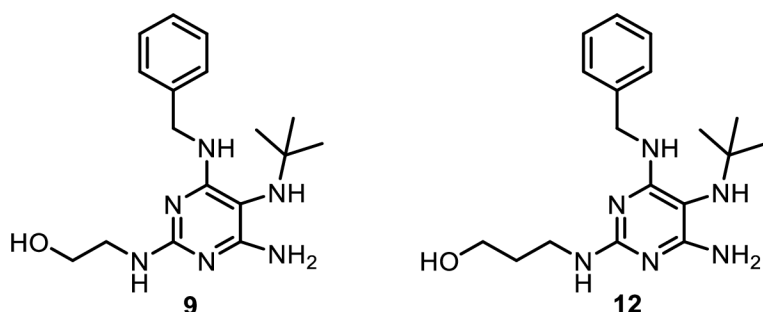


Schéma 30: Struktury vedlejších produktů v případě přípravy analogu olomoucínu I a boheminu

Z toho důvodu bylo zahájeno několik sérií reakcí pro přípravu analogů olomoucínu I a boheminu, kdy se v závislosti na teplotě hledaly ty nejlepší podmínky. Prvotní snahou bylo snižovat teplotu reakce tak dlouho, aby vůbec nedošlo ke vzniku produktu s otevřeným imidazolovým cyklem. To se bohužel nepodařilo ani u jedné z reakcí, za použití původního postupu, které probíhaly při teplotách 160, 150, 130 a 100 °C. Nechtěný produkt začal vždy po určité době v reakční směsi vznikat. V průběhu této optimalizace se podařilo po separaci sloupcovou chromatografií získat analog boheminu (11), který byl připravován při 130 °C po dobu hodiny a půl. Výtěžek však činil necelých

21 %. Navzdory tomu bylo ale zjištěno, že při nižší teplotě vzniká vedlejší produkt později a výchozí látka může delší dobu přecházet v požadovaný analog. Panuje zde poměrně jistá představa, že výchozí látka nejdříve reaguje za vzniku požadovaného produktu do chvíle, kdy v reakční směsi dojde k ustanovení určité rovnováhy a poté současně dochází ke štěpení tohoto produktu, jehož výsledkem je nežádoucí produkt s otevřeným imidazolovým cyklem. Ačkoli se nižší teplotou podařilo částečně odstranit problém s nechtěným produktem v reakční směsi, vyvstal další, a to ten, že se za nižší teploty značně prodlužuje reakční doba, která také nemá pozitivní vliv na průběh reakce, co se týče tvorby vedlejšího produktu. Příkladem mohou být reakce přípravy analogů olomoucínu I a boheminu při 100 °C trvající 29 hodin. Poměr komponent byl v prvním případě pro analog olomoucínu I 10/53/45 (**6/8/9**) a ve druhém pro analog boheminu 10/89/74 (**6/11/12**). Protože tyto reakce trvaly příliš dlouho a obsahovaly značné množství vedlejšího produktu, byly jejich reakční směsi pro získání těchto produktů děleny na semipreparativní HPLC. Látka (**9**) byla následně izolována s výtěžkem 59 % a látka (**12**) s výtěžkem 52 %.

Bylo zapotřebí posunout rovnováhu více směrem ke kýženým produktům. Proto se množství přidávaného aminoalkoholu zvýšilo z 8 ekvivalentů na 20. Vzápětí byly znovu prováděny reakce vedoucí k analogu olomoucínu I (**8**) a boheminu (**11**) s pečlivým monitoringem průběhu. Při reakcích se pro preparativní účely vycházelo ze 100 mg látky (**6**), která výsledně reagovala při 100 °C v inertní atmosféře po dobu 11 hodin s 20 ekvivalenty 2-aminoethan-1-olu a po dobu 14 hodin s 20 ekvivalenty 3-aminopropan-1-olu. Poměr komponent byl v případě analogu olomoucínu I 10/102/15 (**6/8/9**) a v případě analogu boheminu 10/198/41 (**6/11/12**). Analog olomoucínu I (**8**) byl obtížně čištěn pomocí sloupcové chromatografie s výtěžkem 14 %, tudíž se usoudilo, že tato separační metoda není vhodná a muselo se přejít na čištění za pomoci semipreparativní HPLC, kde byl analog boheminu (**14**) získán v 48% výtěžku.

Současně s předchozími deriváty byl připravován i analog roscovitinu (**14**). I zde docházelo k tvorbě vedlejšího produktu s otevřeným imidazolovým cyklem (**33**). U jeho přípravy se začalo na teplotě 130 °C. Screeningová reakce tak probíhala 29 hodin při 130 °C s 8 ekvivalenty (*R*)-2-aminobutan-1-olu. Výsledkem sice byla úplná konverze výchozí látky, ale poměr látek vzniklých ve směsi byl 10/32 (**14/33**). Reakce byla následně opakována a ukončena po 6 hodinách s poměrem komponent 10/14/2 (**6/14/33**). Dále byl

analog roscovitinu čištěn pomocí semipreparativní HPLC a poté izolován s výtěžkem 31 %. Zisk vedlejšího produktu nebyl v tomto případě cílem zájmu.

Reakce vedoucí k přípravě *N*⁷ *tert*-butylovaných purinových analogů inhibitorů CDK olomoucínu I (**8**), boheminu (**11**) a roscovitinu (**14**) shrnuje schéma 31.

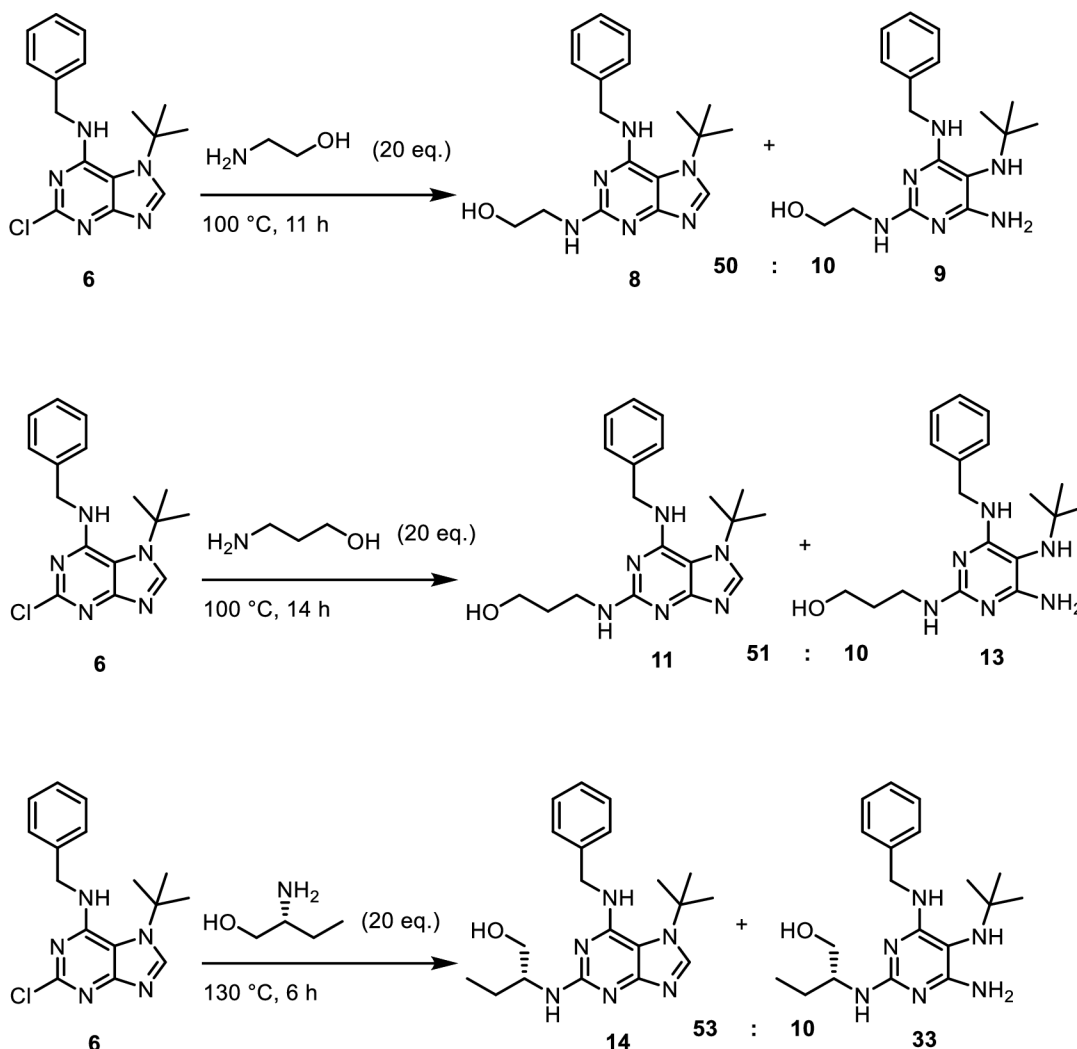


Schéma 31: Přípravy *N*⁷ *tert*-butylovaných analogů olomoucínu I, boheminu a roscovitinu

3.4.3.1 Vliv rozpouštědla na přípravu finálních *N*⁷ produktů

V této kapitole je diskutován vliv DMF na průběh reakce při přípravě analogu boheminu (**11**).

Aby byla reakční směs v průběhu reakce homogennější a docházelo k lepšímu promísení reaktantů, byl tento nápad podpořen přidáním rozpouštědla v podobě DMF. S jeho použitím se neočekávaly žádné významné změny. Byly zahájeny dvě šarže reakcí při 120 a 140 °C v 0,5 ml DMF za zbylých podmínek původního postupu, čímž se mělo hlavně

pozorovat chování směsi v souvislosti s tvorbou vedlejšího produktu. K velkému překvapení však došlo při pozdější analýze v obou šaržích, kdy už po 30 minutách docházelo k nepatrným náznakům píku, jehož molekulová hmotnost odpovídala následující struktuře (Schéma 32). Reakce byly ukončeny po 21 hodinách, kdy na záznamu z chromatogramu již nebylo vidět výchozí látku, ale pouze zcela minoritní požadovaný produkt a dominantní nově vzniklý dimethylamino derivát (**16**). Při 120 °C byly produkty ve vzájemném poměru 10/641 (**11/16**) a při 140 °C 10/262 (**11/16**).

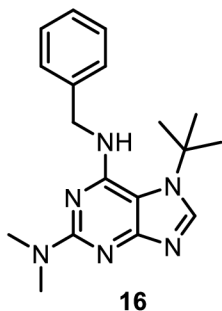


Schéma 32: *N*⁶-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-*N*², *N*²-dimethyl-7*H*-purin-2,6-diamin

Najednou ale nebylo jisté, zda tento nový derivát vzniká jen díky přítomnosti DMF, nebo musí být součástí reakce i aminoalkohol. Z toho důvodu byly provedeny reakce, kde *N*⁷ a *N*⁹ izomer výchozí látky reagoval při 120 °C pouze s DMF, ale ani po 27 hodinách k žádné reakci nedošlo. Reakce byla opakována s reakční dobou 24 h, avšak se stejným výsledkem. Myšlenku, že aminoalkohol či dokonce amin výrazně podporuje tvorbu dimethylamino derivátu, potvrdila reakce výchozí látky v DMF s piperidinem při 120 °C podle původního postupu. Jednou z látek vytvořených během reakce je podle hodnoty molekulové hmotnosti tato struktura (Schéma 33). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

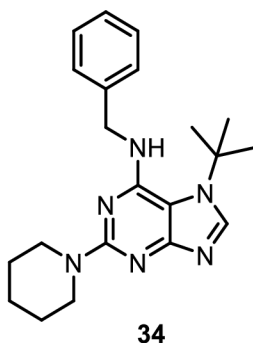


Schéma 33: *N*-benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-(piperidin-1-yl)-7*H*-purin-6-amin

Tabulka 7: Reakce výchozí látky s piperidinem v DMF

reakční čas	Poměr látek (6)/(16)/(34)
1 h	10/38/0
17 h	10/154/244
43,5 h	0/10/16

Hodnoty z LC/MS analýz

V průběhu přípravy analogu boheminu tedy došlo přednostně k rovnovážné reakci mezi DMF a 3-aminopropan-1-olem za uvolnění dimethylaminu, který se substituoval za chlor do polohy 2.

Dimethylamino derivát (**16**) byl také pro zajímavost izolován v surovém stavu (58 %) z cílené reakce podle schématu 34.

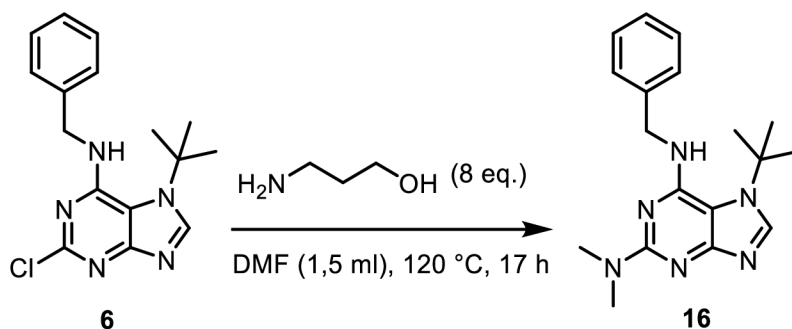


Schéma 34: Příprava *N*⁶-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-*N*², *N*²-dimethyl-7*H*-purin-2,6-diaminu

3.4.3.2 Otevírání imidazolového kruhu

Při syntéze *N*⁷ analogů purinových inhibitorů CDK bylo nutné se potýkat s nepříjemností spojenou se vznikem vedlejších produktů, jejichž struktura vykazovala rozštěpený imidazolový kruh se ztrátou uhlíku C⁸ purinového skeletu. Nabízí se otázka, čím je ono štěpení způsobeno. Nestabilita imidazolového cyklu byla prozatím testována s bazicky působícími činidly. Typ látky a reakční podmínky uvádí tabulka 8.

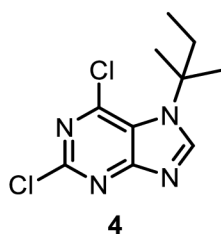
Tabulka 8: Potencionální reakce způsobující otevření imidazolového kruhu

čínidlo	rozpuštědlo	teplota	reakční čas	otevření
DIPEA	-	130 °C	24 h	Ne
DIPEA	H ₂ O	130 °C	28 h	Ne
DIPEA	DMF	120 °C	23 h	Ne
MeONa	MeOH	RT	30 min	Ne
MeONa	MeOH	50 °C	21 h	Ne
MeONa	MeOH	90 °C	2,5 h	Ne
MeONa	DMF	50 °C	21 h	Ne
MeONa	DMF	90 °C	2,5 h	Ne

Z výsledků všech uvedených reakcí bohužel plyne závěr, že ani jedna z nich nezpůsobuje otevření imidazolového kruhu. Na otázku, co otevírání způsobuje, zatím neexistuje jednoznačná odpověď. Domněnkou je přítomnost aminoalkoholu v reakční směsi, či navázaný substituent v poloze 2.

3.5 Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Protože se u připravovaných látek, jimiž se tato práce zabývá, předpokládala určitá míra biologické aktivity, byly téměř všechny připravené sloučeniny otestovány na kináze CDK2/E, kde však jejich inhibiční účinky podle hodnot IC₅₀ byly příliš slabé. Dále byly testovány na cytotoxickou aktivitu v případě leukemických linií K562 (erythrocytická leukémie) a MV4-11 (myeloidní leukémie). Cytotoxicita, která by stála za zmínku, je pouze v případě linie MV4-11, neboť jde o hypersenzitivní linii. Zde je nejúčinnější látkou sloučenina (**4**) s hodnotou IC₅₀ 4,2 μM.

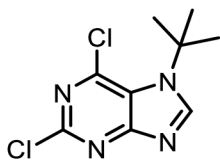


Obecně lze však říct, že tyto sloučeniny s navázaným *tert*-butylovým postranním řetězcem ať už v poloze *N*⁷, nebo *N*⁹, nejsou nijak významně biologicky aktivní.

4 Experimentální část

Všechny připravované látky byly syntetizovány z komerčně dostupných sloučenin bez čištění v kvalitě deklarované výrobcem. Při reakcích vyžadujících nepřítomnost vody byly použity komerčně dostupná bezvodá rozpouštědla s deklarovaným maximálním obsahem vody dosučená pomocí molekulových sít. Upotřebené bylo molekulové síto 3A pro ACN a DCE. Průběh chemických reakcí a čistota připravených sloučenin byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie na hliníkových foliích DC-Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), detekce byla provedena pomocí UV záření ($\lambda = 254$ nm). 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 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. 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. HPLC čištění bylo prováděno systémem Agilent Technologies 1200 HPLC na koloně C-18 (20 x 150 mm, částice 5 μm), gradient byl vytvořen z acetonitrilu a 0,01M octanu amonného ve vodě při průtoku 15 ml/min. ^1H a ^{13}C 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 (^{13}C), respektive na spektrometru JEOL ECX500 při frekvenci 500 MHz (^1H) a 100 MHz (^{13}C). Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v jednotkách ppm s kalibrací na signál reziduálního rozpouštědla. Zbytkový signál octanu amonného (z čištění HPLC) vykazoval hodnotu v CDCl₃ při 1,9 ppm (^1H) a při 21,3 ppm a 172 ppm (^{13}C). Teplota tání byla stanovena na Boetiově bloku, hodnoty nejsou korigovány.

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



Metoda A:

2,6-Dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 250ml tříhrdlé baňky (5 g; 26,5 mmol). Na baňku byl nasazen zpětný chladič. Aparatura byla vypláchnuta a naplněna argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (190 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (9,7 ml; 39,7 mmol). Reakční směs byla refluxována v olejové lázni a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid cíničitý (6,5 ml; 55,6 mmol) a ihned poté *tert*-butylbromid (8,9 ml; 79,4 mmol). V ledové lázni při 0 °C byla reakční směs ponechána po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (53 ml) a poté chloroform (265 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (1x 159 ml; 2x 370 ml; 1x 159 ml) a následně byla promyta solankou (370 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána nažloutlá krystalická látka v surovém stavu (4,68 g; 75 %). Látka byla rekrystalizována při refluxu ve 335 ml isopropanolu, dále byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté v ledové lázni. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí isopropanolem a sušení v sušárně po dobu 1 h při 120 °C byla získána bílá krystalická látka (3,91 g; 61 %).

Metoda B:

Příprava 7-(*tert*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purinu (**2**) metodou B proběhla analogicky jako v metodě A. 2,6-Dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 10ml vialky (189 mg; 1,00 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (8 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 µl; 1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku při 80 °C a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid cíničitý (248 µl; 8,40 mmol) a ihned poté *tert*-butylacetát (404 µl; 3,00 mmol). V ledové lázni při 0 °C byla reakční směs ponechána po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (2 ml) a poté chloroform (12 ml). Organická fáze byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (1x 8 ml; 2x

14 ml; 1x 8 ml), následně byla promyta solankou (14 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření a sušení v sušárně po dobu 1 h při 120 °C byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (156,8 mg; 64 %).

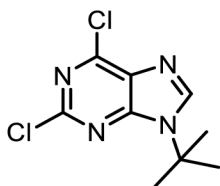
Teplota tání: 193-195 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₀Cl₂N₄, 245.0355; naměřené 245.0364

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.47 (s, 1H), 1.90 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 165.5, 152.8, 148.3, 143.6, 122.4, 59.6, 31.1

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



Metoda A:

9-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purin (**3**) byl připraven analogicky postupem přípravy látky (**2**). 2,6-Dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 250ml tříhrdlé baňky (5 g; 26,5 mmol). Na baňku byl nasazen zpětný chladič. Aparatura byla vypláchnuta a naplněna argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (190 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (9,7 ml; 39,7 mmol). Reakční směs byla refluxována v olejové lázni a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid cíničitý (6,5 ml; 55,6 mmol) a ihned poté *tert*-butylbromid (8,9 ml; 79,4 mmol). Reakční směs byla opět ponořena do olejové lázně na 80 °C po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (53 ml) a poté chloroform (265 ml). Organická fáze pak byla extrahována jednou destilovanou vodou (159 ml), jednou NaHCO₃ (370 ml) a znovu dvakrát destilovanou vodou (370 ml; 159 ml), následně byla promyta solankou (370 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána nažloutlá krystalická látka v surovém stavu (4,88 g; 75 %). Látka byla rekrystalizována při refluxu ve 100 ml isopropanolu, dále byla ochlazena na

laboratorní teplotu a poté v ledové lázni. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí isopropanolem a sušení v sušárně po dobu 1 h při 120 °C byla získána bílá krystalická látka (3,69 g; 57 %).

Metoda B:

Příprava 9-(*tert*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purinu (**3**) metodou B proběhla analogicky jako v metodě A. 2,6-Dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 10ml vialky (189 mg; 1,00 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (8 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 μ l; 1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku při 80 °C a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Aparatura byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid cíničitý (248 μ l; 8,40 mmol) a ihned poté *tert*-butylacetát (404 μ l; 3,00 mmol). Reakční směs byla opět ponořena do olejové lázně na 80 °C po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (2 ml) a poté chloroform (12 ml). Organická fáze byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (1x 8 ml; 2x 14 ml; 1x 8 ml), následně byla promyta solankou (14 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření a sušení v sušárně po dobu 1 h při 120 °C byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (196,7 mg; 80 %).

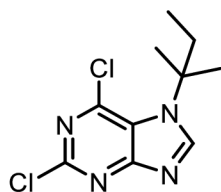
Teplota tání: 181-182 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₉H₁₀Cl₂N₄, 245.0355; naměřené 245.0357

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.17 (s, 1H), 1.81 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 153.1, 151.79, 151.76; 143.6, 131.9, 59.0, 28.9

2,6-Dichlor-7-(*tert*-pentyl)-7*H*-purin (**4**)



2,6-Dichlor-7-(*terc*-pentyl)-7*H*-purin (**4**) byl připraven analogicky postupem přípravy látky (**2**). 2,6-dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 10ml vialky (189 mg; 1,00 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (8 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 μ l; 1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku při 80 °C a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid ciničitý (248 μ l; 8,40 mmol) a ihned poté neopentylbromid (383,4 μ l; 3,00 mmol). V ledové lázni při 0 °C byla reakční směs ponechána po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (2 ml) a poté chloroform (12 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (1x 8 ml; 2x 14 ml; 1x 8 ml), následně byla promyta solankou (14 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (143,1 mg; 55 %). Látka byla rekrystalizována při refluxu ve 2 ml isopropanolu, dále byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté v ledové lázni. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí isopropanolem a sušení v lyofilizátoru byla získána bílá krystalická látka (113,1 mg; 44 %).

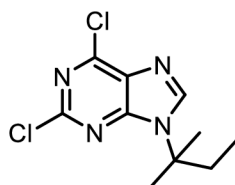
Teplota tání: 115-117 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₀H₁₂Cl₂N₄, 259.0512; naměřené 245.0511

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.43 (s, 1H), 2.28 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.85 (s, 6H), 0.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 165.6, 152.7, 149.0, 143.7, 122.4, 62.8, 34.5, 28.6, 8.4

2,6-Dichlor-9-(*terc*-pentyl)-9*H*-purin (**5**)



2,6-Dichlor-9-(*tert*-pentyl)-9*H*-purin (**5**) byl připraven analogicky postupem přípravy látky (**3**). 2,6-Dichlor-9*H*-purin (**1**) byl navážen do 10ml vialky (189 mg; 1,00 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Dále byl přidán bezvodý acetonitril (8 ml) a *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (368 μ l; 1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána v termobloku při 80 °C a reakce byla míchána po 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla poté zchlazena v ledové lázni na 0 °C a byl přidán chlorid cínčitý (248 μ l; 8,40 mmol) a ihned poté neopentylbromid (383,4 μ l; 3,00 mmol). Reakční směs byla opět vsazena do termobloku na 80 °C po dobu 3 h. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl nejprve přidán isopropanol (2 ml) a poté chloroform (12 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (1x 8 ml; 2x 14 ml; 1x 8 ml), následně byla promyta solankou (14 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (210,6 mg; 81 %). Látka byla rekrystalizována při refluxu ve 2 ml isopropanolu, dále byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté v ledové lázni. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí isopropanolem a sušení v lyofilizátoru byla získána bílá krystalická látka (156,5 mg; 60 %).

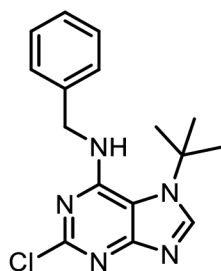
Teplota tání: 107-108 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₀H₁₂Cl₂N₄, 259.0512; naměřené 259.0511

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.13 (s, 1H), 2.21 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.78 (s, 6H), 0.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 153.1, C 151.77, 151.76; 144.3, 131.8, 62.1, 32.8, 26.6, 8.2

N-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**)



7-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (**2**) byl navážen do 50ml baňky (1 g; 3,17 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Poté byl přidán *n*-butanol (20,4 ml), DIPEA (1,4 ml; 8,2 mmol) a benzylamin (668 μ l; 6,12 mmol). Reakční směs se nechala přibližně 2 minuty probublávat argonem pro vyloučení nežádoucího kyslíku v *n*-butanolu. Aparatura byla uzavřena a reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 3 h při 110 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Aparatura byla zchlazena na laboratorní teplotu a dále v ledové lázni. Vyloučená látka byla přefiltrována na Büchnerově nálevce, promyta isopropanolem a po sušení v sušárně po dobu 1 h při 80 °C byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (893,6 mg; 69 %).

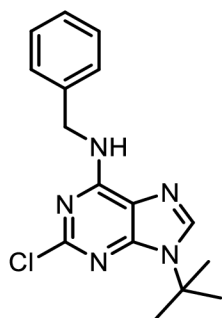
Teplota tání: 190-191 °C

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₆H₁₈ClN₅, 316.1323; naměřené 316.1321

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.10 (s, 1H), 7.39-7.31 (m, 5H), 5.49 (bs, 1H), 4.85 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.73 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.1, 154.1, 150.2, 142.9, 137.6, 129.0, nejpravděpodobněji 2x C 127.9, 110.7, 56.5, 46.3, 31.6

N-Benzyl-9-(*terc*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**)



N-Benzyl-9-(*terc*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**) byl připraven analogicky postupem přípravy látky *N*-benzyl-7-(*terc*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**). 9-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purin (**3**) byl navážen do 50ml baňky (1 g; 3,2 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Poté byl přidán *n*-butanol (20,4 ml), DIPEA (1,4 ml; 8,2 mmol) a benzylamin (668 μ l; 6,12 mmol). Reakční směs se nechala přibližně 2 minuty probublávat argonem pro vyloučení nežádoucího kyslíku v *n*-butanolu. Aparatura byla uzavřena a reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 2 h při

110 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Aparatura byla zchlazena na laboratorní teplotu a dále v ledové lázni. Vyloučená látka byla přefiltrována na Büchnerově nálevce, promyta isopropanolem a po sušení v sušárně po dobu 1 h při 80 °C byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (921,8 mg; 72 %).

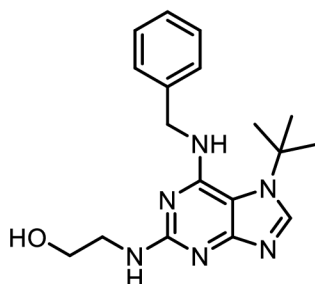
Teplota tání: 170-172 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₆H₁₈ClN₅, 316.1323; naměřené 316.1327

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.63 (s, 1H), 7.37-7.27 (m, 5H), 6.76 (bs, 1H), 4.83 (bs, 2H), 1.73 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 155.2, 153.5, 150.4, 138.1, 137.7, 128.7, 127.9, 127.6, 119.7, 57.6, 44.5, 29.0

2-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**8**)



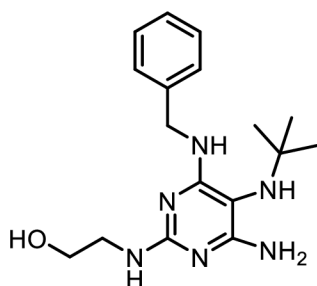
N-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán 2-aminoethan-1-ol (383 μl; 6,33 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 11 h při 100 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána medovitá tmavě béžová látka. Dále byla provedena sloupcová chromatografie (průměr kolony 4,5 cm; výška sloupce silikagelu 10 cm, mobilní fáze CHCl₃:MeOH; 40:7). Po odpaření frakcí na RVO a sušení v lyofilizátoru byla získána sypká bílá látka (14,9 mg; 14 %).

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₈H₂₄N₆O, 341.2084; naměřené 341.2082

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.01 (s, 1H), 7.37-7.17 (m, 5H), 6.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.90 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.44 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.25 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 1.68 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.4, 158.5, 149.4, 141.7, 140.6, 128.1, 127.1, 126.3, 105.5, 60.6, 55.6, 44.1, 43.8, 30.9

2-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**9**)



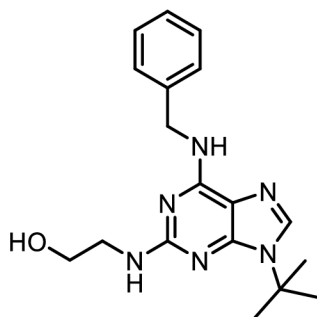
2-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**9**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**8**). *N*-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán 2-aminoethan-1-ol (153 μl ; 2,53 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 29 h při 100 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO_4 a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána medovitá tmavě béžová látka. Dále byla provedena semipreparativní HPLC, kde byl hlavní produkt (**9**) separován od produktu (**8**). Po odpaření frakcí a sušení v lyofilizátoru byla získána olejovitá látka (62 mg; 59 %).

HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočítané pro $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$, 331.2241; naměřené 331.2239

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 7.32-7.25 (m, 5H), 5.94 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.51 (bs, 1H), 4.55 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.47 (q, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.13 (s, 9H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 162.7, 154.4, 153.1, 138.5, 128.6, 127.5, 127.4, 92.7, 61.8, 54.6, 45.0, 44.1, 30.6

2-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**10**)



N-Benzyl-9-(*tert*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán 2-aminoethan-1-ol (153 μ l; 2,53 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 3 h při 150 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (96,4 mg; 89 %). Látka byla rekrystalizována při varu ve 2,2 ml acetonitrilu, dále byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté v lednici při 0 °C. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí acetonitrem a sušení při laboratorní teplotě byla získána bílá krystalická látka (37,3 mg; 35 %).

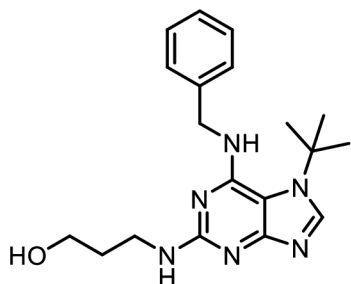
Teplota tání: 116-118 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₈H₂₄N₆O, 341.2084; naměřené 341.2087

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.42 (s, 1H), 7.34-7.20 (m, 5H), 6.39 (bs, 1H), 5.27 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.73 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 4.45-4.67 (bs, 1H), 3.79 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.53 (q, *J* 5.6 Hz, 2H), 1.67 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 159.5, 155.0, 151.0, 139.0, 134.7, 128.5, 127.6, 127.2, 115.8, 64.1, 56.4, 45.0, 44.3, 28.9

3-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**11**)



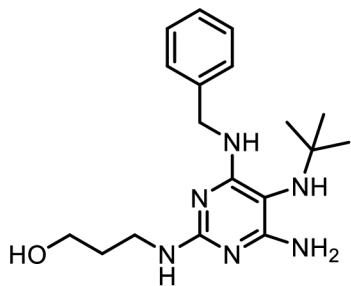
3-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**11**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**8**). *N*-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Poté byl přidán 3-aminopropan-1-ol (484,4 μ l; 6,33 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 14 h při 100 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze pak byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána medovitá tmavě béžová látka. Dále byla provedena semipreparativní HPLC, kde byl hlavní produkt (**11**) separován od produktu (**12**). Po odpaření frakcí na RVO a sušení v lyofilizátoru byla získána sypká jemně nažloutlá látka (53,9 mg; 48 %)

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₉H₂₆N₆O, 355.2241; naměřené 355.2273

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (s, 1H), 7.38-7.16 (m, 5H), 6.38 (bs, 1H), 6.06 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.23 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.68 (s, 9H), 1.58 (quin, *J* = 6.4 Hz, 2H)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.5, 158.6, 149.4, 141.6, 140.7, 128.1, 127.1, 126.3, 105.3, 58.7, 55.6, 44.1, 38.1, 32.8, 30.9

3-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)propan-1-ol
(**12**)



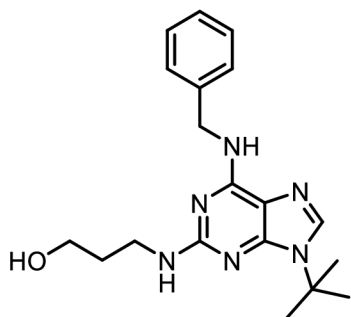
3-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)propan-1-ol (**12**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**8**). *N*-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán 3-aminopropan-1-ol (194 μ l; 2,54 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 29 h při 100 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána medovitá tmavě béžová látka. Dále byla provedena semipreparativní HPLC, kde byl hlavní produkt (**12**) separován od produktu (**11**). Po odpaření frakcí na RVO a sušení v lyofilizátoru byla získána sypká světle červená látka (56,8 mg; 52 %).

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₈H₂₆N₆O, 345.2397; naměřené 345.2397

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.33-7.25 (m, 5H), 5.72 (bs, 1H), 4.94 (bs, 1H), 4.53 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.67 (quin, *J* = 5.8 Hz, 2H), 1.13 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 162.4, 160.6, 159.2, 139.7, 128.5, 127.6, 127.1, 94.8, 58.1, 54.3, 45.0, 37.0, 33.6, 30.9

3-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**13**)



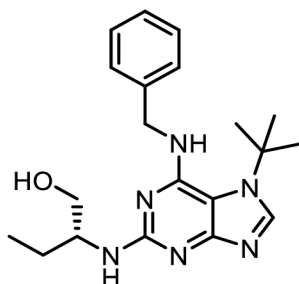
3-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**13**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**10**). *N*-Benzyl-9-(*tert*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán 3-aminopropan-1-ol (194 μ l; 2,54 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 3 h při 150 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Dále byla provedena sloupcová chromatografie (průměr kolony 4,5 cm; výška sloupce silikagelu 10 cm, mobilní fáze CHCl₃:MeOH; 40:1). Po odpaření frakcí na RVO a sušení v lyofilizátoru byla získána sypká bílá látka (82,9 mg; 74 %).

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₉H₂₆N₆O, 355.2241; naměřené 355.2233

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.46 (s, 1H), 7.36-7.22 (m, 5H), 6.19 (bs, 1H), 4.95 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.58 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.78 (quin, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.70 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 159.3, 155.0, 151.4, 138.9, 134.7, 128.5, 127.7, 127.2, 115.5, 59.3, 56.4, 44.4, 38.0, 33.0, 29.0

(*R*)-2-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol (**14**)



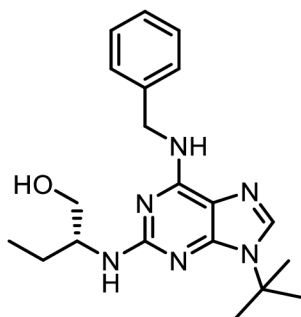
(*R*)-2-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol (**14**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**8**). *N*-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Poté byl přidán (*R*)-2-aminobutan-1-ol (598,4 μ l; 6,33 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 6 h při 130 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána medovitá tmavě béžová látka. Dále byla provedena semipreparativní HPLC, kde byl hlavní produkt (**14**) separován od produktu (**33**). Po odpaření frakcí na RVO a sušení v lyofilizátoru byla získána sypká nažloutlá látka (37 mg; 31 %).

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₂₀H₂₈N₆O, 369.2397; naměřené 369.2393

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (s, 1H), 7.37-7.16 (m, 5H), 6.36 (bs, 1H), 5.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.77 (ddd, *J* = 24.9, 15.0, 5.3 Hz, 2H), 3.72 (td, *J* = 13.3, 5.4 Hz, 1H), 3.42 (dd, *J* = 10.5, 4.7 Hz, 1H), 3.29 (dd, *J* = 10.5, 5.6 Hz, 1H), 1.68 (s, 9H), 1.59-1.52 (m, 1H), 1.43-1.32 (m, 1H), 0.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.2, 158.4, 149.4, 141.7, 140.6, 128.1, 127.1, 126.3, 105.3, 63.2, 55.7, 53.8, 44.1, 30.9, 23.8, 10.5

(*R*)-2-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol (**15**)



(*R*)-2-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol (**15**) byl připraven analogickým postupem přípravy látky (**10**). *N*-Benzyl-9-(*tert*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (**7**) byl navážen do LC/MS vialky (100 mg; 0,32 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Poté byl přidán (*R*)-2-aminobutan-1-ol (242 μ l; 2,56 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 30 h při 150 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán chloroform (2 ml). Organická fáze byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) následně byla promyta solankou (2ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření byla získána bílá krystalická látka v surovém stavu (104 mg; 89 %). Látka byla rekrystalizována při varu ve 2 ml acetonitrilu, dále byla ochlazená na laboratorní teplotu a poté v lednici při 0 °C. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí acetonitrem a sušení při laboratorní teplotě byla získána bílá krystalická látka (67,4 mg; 58 %).

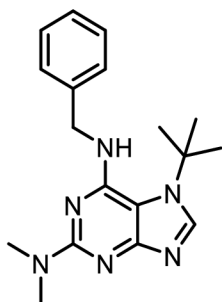
Teplota tání: 132-134 °C

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₂₀H₂₈N₆O, 369.2397; naměřené 369.2391

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.45 (s, 1H), 7.36-7.23 (m, 5H), 6.18 (bs, 1H), 4.87 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.78-4.68 (m, 2H), 4.44 (bs, 1H), 3.89 (quind, *J* = 7.0, 3.1 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 10.7, 3.1 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J* = 10.7, 7.6 Hz, 1H), 1.69 (s, 9H), 1.58 (dekaplet, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 159.3, 154.9, 150.9, 138.9, 134.8, 128.5, 127.7, 127.3, 115.8, 67.7, 56.4, 55.9, 44.4, 28.9, 24.9, 10.9

*N*⁶-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-*N*², *N*²-dimethyl-7*H*-purin-2,6-diamin (**16**)



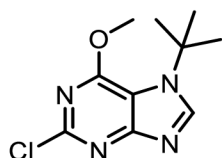
N-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**) byl navážen do LC/MS vialky (75 mg; 0,24 mmol) , která byla následně vypláchnuta a naplněná argonem. Poté byl přidán bezvodý dimethylformamid (1,5 ml, 19,4 mmol) a 3-aminopropan-1-ol (145 μ l; 1,89 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni po dobu 17 h při 120 °C za vyloučení vzdušné vlhkosti. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán ethylacetát (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml), následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření a sušení při laboratorní teplotě byla získána světle červená sypká látka v surovém stavu (44,9 mg; 58 %).

HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₈H₂₄N₆, 325.2135; naměřené 325.2163

¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.87 (s, 1H), 7.38-7.28 (m, 5H), 5.15 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.16 (s, 6H), 1.69 (s, 9H)

¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 164.5, 159.6, 149.3, 141.0, 139.2, 128.7, 127.5, 127.3, 105.2, 55.3, 45.6, 37.4, 31.4

7-(*Tert*-butyl)-2-chlor-6-methoxy-7*H*-purin (**17**)



7-(*Tert*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (**2**) byl navážen do 5ml vialky (100 mg; 0,41 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Dále byl přidán methanol (2 ml) a methanolát sodný (1,22 ml; 1 mmol/ml). Reakční směs byla míchána při laboratorní

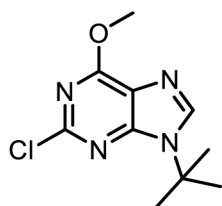
teplotě po dobu 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti a potom byla zneutralizována zředěnou kyselinou octovou. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán toluen (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření a sušení při laboratorní teplotě byla získána jemně naoranžovělá sypká látka v surovém stavu (68,5 mg; 70 %).

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₀H₁₃ClN₄O, 241.0851; naměřené 241.0853

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.16 (s, 1H), 4.19 (s, 3H), 1.72 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 164.8, 156.3, 152.5, 144.3, 111.5, 58.3, 55.0, 30.0

9-(*Terc*-butyl)-2-chlor-6-methoxy-9*H*-purin (**18**)



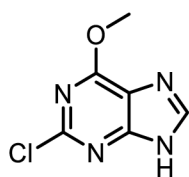
9-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purin (**3**) byl navážen do 5ml vialky (100 mg; 0,41 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Dále byl přidán methanol (2 ml) a methanolát sodný (1,22 ml; 1 mmol/ml). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 30 minut za vyloučení vzdušné vlhkosti a potom byla zneutralizována zředěnou kyselinou octovou. Byla provedena extrakce. K reakční směsi byl přidán toluen (2 ml). Organická fáze pak byla extrahována čtyřikrát destilovanou vodou (2 ml) a následně byla promyta solankou (2 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄ a odpařena na RVO. Po odpaření a sušení při laboratorní teplotě byla získána bílá sypká látka v surovém stavu (77,7 mg; 79 %).

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₁₀H₁₃ClN₄O, 241.0851; naměřené 241.0850

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.95 (s, 1H), 4.16 (s, 3H), 1.77 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 161.4, 153.2, 151.7, 140.2, 121.8, 57.9, 54.7, 29.0

2-Chlor-6-methoxy-9H-purin (**19**)



2,6-Dichlor-9H-purin (**1**) byl navážen do 5ml vialky (189 mg; 1 mmol), která byla následně vypláchnuta a naplněna argonem. Dále byl přidán methanolát sodný (3 ml; 1 mmol/ml). Reakční směs byla míchána při 70°C po dobu 2 h za vyloučení vzdušné vlhkosti. Reakční směs byla odpařena na RVO. Pak k ní byla přidána destilovaná voda (5 ml) a reakční směs byla zneutralizována zředěnou kyselinou octovou za vyloučení sraženiny. Po přefiltrování na Büchnerově nálevce, promytí destilovanou vodou a sušení při laboratorní teplotě byla získána bílá sypká látka v surovém stavu (144,7 mg; 74 %).

HRMS (ESI, m/z): [M+H]⁺ vypočítané pro C₆H₅ClN₄O, 185.0225; naměřené 185.0255

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.59 (bs, 1H), 8.41 (s, 1H), 4.08 (s, 3H)

5 Závěr

Literatura zabývající se chemií purinů nenabízí účinné metody přípravy derivátů, které by měly zavedený terciární zbytek do polohy N^7 . Tím pádem je i málo informací ohledně jejich biologické aktivity. Jedním z cílů této bakalářské práce bylo tento nedostatek vyřešit a pokusit se tak najít optimální metodu, která by regioselektivní syntézu N^7 *terc*-alkylovaných derivátů 2,6-dichlorpurinu umožňovala a biologickým testováním bylo by možné se pak dovědět o jejich vlivech na živé organismy více. Z toho důvodu byla aplikována nová silylační metoda, jejímž vývojem a propracováním došlo úspěšně k objevu optimálních podmínek pro regioselektivní zavedení terciárního alkyly, konkrétně *terc*-butylu, do polohy N^7 i N^9 v souvislosti s použitím *terc*-halogenderivátu, což bylo ověřeno i na dalším *terc*-alkylu neopentylu.

Aplikovaná silylační metoda pro regioselektivní zavedení *terc*-butylového zbytku do polohy N^7 a N^9 2,6-dichlorpurinu probíhala nejen pomocí *terc*-butylbromidu, ale i málo toxického *terc*-butylacetátu v acetonitrilu za přítomnosti katalyzátoru chloridu cínitého. Pečlivým postupem při optimalizaci podmínek a zpracováním byly výsledné produkty 7-(*terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin a 9-(*terc*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purin izolovány ve velmi dobrém výtěžku, ve vysoké čistotě a s vysokým stupněm konverze s maximální možnou eliminací tvorby nežádoucích izomerů. Nově popsaná metoda je selektivní pro zavádění terciárních zbytků, což popsané metody nalezené v literatuře neumožňují.

Připravené N^7 a N^9 *terc*-butylované prekurzory byly zdárně využity k přípravě purinových analogů inhibitorů CDK olomoucínu I, boheminu a roscovitinu. V procesu přípravy těchto analogů CDK byl nalezen rozdíl v reaktivitě N^7 a N^9 izomerů, kdy N^7 izomery při substituční reakci do polohy 2 na rozdíl od N^9 izomerů vykazovaly neočekávané otevírání imidazolového cyklu, což značně zkomplikovalo syntézu finálních N^7 produktů. Navzdory tomu však byly objeveny vyhovující podmínky.

Hlubším zkoumáním byl také nalezen rozdíl ve stabilitě *terc*-butylového zbytku, kdy byl v případě N^7 izomeru v kyselém prostředí a v přítomnosti Lewisovy kyseliny nestabilní na rozdíl od N^9 izomeru, neboť docházelo k jeho odštěpení v souvislosti se zpětnou tvorbou 2,6-dichlorpurinu a izomerací na stabilnější N^9 izomer.

Celkem bylo připraveno 15 nových sloučenin s ověřenou strukturou pomocí spektrálních metod a tyto sloučeniny byly zaslány na cytotoxickou aktivitu a CDK inhibici. Naneštěstí

jsou připravené sloučeniny jen velmi málo biologicky aktivní a z tohoto pohledu ztrácí svůj význam.

6 Seznam použité literatury

- (1) 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>.
- (2) Fidiás, 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>.
- (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) 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>.
- (5) Veselý, J.; Havlíček, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J. -y; 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>.
- (6) 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>.
- (7) https://cs.wikipedia.org/wiki/Cyklin-dependentní_kináza.
- (8) <https://cs.wikipedia.org/wiki/Cyklin>.
- (9) 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>.
- (10) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* (80-.). **2002**, *298* (5600),

- 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- (11) Echaliier, A.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. M. Recent Developments in Cyclin-Dependent Kinase Biochemical and Structural Studies. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.002>.
 - (12) Evans, T.; Rosenthal, E. T.; Youngblom, J.; Distel, D.; Hunt, T. Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division. *Cell* **1983**, *33* (2), 389–396. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8).
 - (13) Kornev, A. P.; Taylor, S. S. Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804* (3), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>.
 - (14) Lolli, G. Structural Dissection of Cyclin Dependent Kinases Regulation and Protein Recognition Properties. *Cell Cycle* **2010**, *9* (8), 1551–1561. <https://doi.org/10.4161/cc.9.8.11195>.
 - (15) 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>.
 - (16) Hunt, T. Cyclins and Their Partners: From a Simple Idea to Complicated Reality. *Semin. Cell Biol.* **1991**, *2* (4), 213–222.
 - (17) 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).
 - (18) 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>.
 - (19) Harper, J. W.; Adams, P. D. Cyclin-Dependent Kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (8), 2511–2526. <https://doi.org/10.1021/cr0001030>.
 - (20) https://www.wikiskripta.eu/w/Buněčný_cyklus.

- (21) Whittaker, S. R.; Mallinger, A.; Workman, P.; Clarke, P. A. Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Cancer Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *173*, 83–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>.
- (22) 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).
- (23) 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).
- (24) 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).
- (25) Knockaert, M.; Lenormand, P.; Gray, N.; Schultz, P.; Pouysségur, 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>.
- (26) Wang, S.; McClue, S. J.; Ferguson, J. R.; Hull, J. D.; Stokes, S.; Parsons, S.; Westwood, R.; Fischer, P. M. Synthesis and Configuration of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine and Its Enantiomer. *Tetrahedron Asymmetry* **2001**, *12* (20), 2891–2894. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(01\)00471-2](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(01)00471-2).
- (27) 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>.
- (28) O'Connor, D. S.; Wall, N. R.; Porter, A. C. G.; 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).
- (29) Matushansky, I.; Radparvar, F.; Skoultchi, A. I. Reprogramming Leukemic Cells to Terminal Differentiation by Inhibiting Specific Cyclin-Dependent Kinases in G1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (26), 14317–14322. <https://doi.org/10.1073/pnas.250488697>.

- (30) Sandal, T.; Stapnes, C.; Kleivdal, H.; Hedin, L.; Døskeland, S. O. A Novel, Extraneuronal Role for Cyclin-Dependent Protein Kinase 5 (CDK5): Modulation of CAMP-Induced Apoptosis in Rat Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (23), 20783–20793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112248200>.
- (31) Lu, W.; Sengupta, S.; Petersen, J. L.; Akhmedov, N. G.; Shi, X. Mitsunobu Coupling of Nucleobases and Alcohols: An Efficient, Practical Synthesis for Novel Nonsugar Carbon Nucleosides. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (13), 5012–5015. <https://doi.org/10.1021/jo070515+>.
- (32) 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>.
- (33) 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>.
- (34) Calderón-arancibia, J.; Espinosa-bustos, C.; Cañete-molina, Á.; Tapia, R. A.; Faúndez, M.; Torres, M. J.; Aguirre, A.; Paulino, M.; Salas, C. O. Synthesis and Pharmacophore Modelling of 2,6,9-Trisubstituted Purine Derivatives and Their Potential Role as Apoptosis-Inducing Agents in Cancer Cell Lines. **2015**, 6808–6826. <https://doi.org/10.3390/molecules20046808>.
- (35) Mott, B. T.; Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Ang, K. K.; Leister, W.; Shen, M.; Silveira, J. T.; Doyle, P. S.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H.; Inglese, J.; Austin, C. P.; Thomas, C. J.; Shoichet, B. K.; Maloney, D. J. Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 52–60. <https://doi.org/10.1021/jm901069a>.
- (36) Dalby, C.; Bleasdale, C.; Clegg, W.; Elsegood, M. R. J.; Golding, B. T.; Griffin, R. J. Regiospezifische Alkylierung von 6-Chlor- Und 2,6-Dichlorpurin an N7 Unter Verwendung von Methylcobaloxim Als Schutzgruppe. *Angew. Chemie*

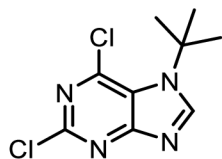
- 1993**, *105* (12), 1822–1823. <https://doi.org/10.1002/ange.19931051230>.
- (37) Langli, G.; Gundersen, L.-L.; Rise, F. Regiochemistry in Stille Couplings of 2,6-Dihalopurines. *Tetrahedron* **1996**, *52* (15), 5625–5638. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00199-8](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00199-8).
- (38) 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>.
- (39) Planken, S.; Behenna, D. C.; Nair, S. K.; Johnson, T. O.; Nagata, A.; Almaden, C.; Bailey, S.; Ballard, T. E.; Bernier, L.; Cheng, H.; Cho-Schultz, S.; Dalvie, D.; Deal, J. G.; Dinh, D. M.; Edwards, M. P.; Ferre, R. A.; Gajiwala, K. S.; Hemkens, M.; Kania, R. S.; Kath, J. C.; Matthews, J.; Murray, B. W.; Niessen, S.; Orr, S. T. M.; Pairish, M.; Sach, N. W.; Shen, H.; Shi, M.; Solowiej, J.; Tran, K.; Tseng, E.; Vicini, P.; Wang, Y.; Weinrich, S. L.; Zhou, R.; Zientek, M.; Liu, L.; Luo, Y.; Xin, S.; Zhang, C.; Lafontaine, J. Discovery of N -((3 R ,4 R)-4-Fluoro-1-(6-((3-Methoxy-1-Methyl-1 H -Pyrazol-4-Yl)Amino)-9-Methyl-9 H -Purin-2-Yl)Pyrrolidine-3-Yl)Acrylamide (PF-06747775) through Structure-Based Drug Design: A High Affinity Irreversible Inhibitor Targeting Oncogenic EGF. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (7), 3002–3019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01894>.
- (40) 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>.
- (41) 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>.
- (42) Kotek, V.; Tobrman, T.; Dvořák, D. Highly Efficient and Broad-Scope Protocol for the Preparation of 7-Substituted 6-Halopurines via N 9-Boc-Protected 7,8-Dihydropurines. *Synthesis (Stuttg.)* **2012**, *44* (4), 610–618. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1290068>.
- (43) Montgomery, J. A.; Hewson, K. 7 - Substituted 7H-Purines. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (11), 4469–4472. <https://doi.org/10.1021/jo01069a066>.
- (44) Grözinger, K. G.; Onan, K. D. Syntheses and Reactions of Some 1-substituted-7-

- alkyl-2-thioxopurines: X-Ray Structure of 6-methylamino-7-nonyl-2-thioxopurine. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, 23 (3), 737–745. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570230319>.
- (45) 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).
- (46) 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).
- (47) 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>.
- (48) Hakimelahi, G. H.; Tai Wei Ly; 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>.
- (49) Jähne, G.; Kroha, H.; Müller, A.; Helsing, 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>.
- (50) 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), 1874–1878. <https://doi.org/10.1039/c3ob27473j>.
- (51) Helmut Vorbrüggen, C. R.-P. *Handbook of Nucleoside Synthesis*; Wiley&Sons, 2001. ISBN: 978-0-471-09383-1.
- (52) Egli, M.; Flavell, A.; Pyle, A. M.; Wilson, W. D.; Haq, S. I.; Luisi, B.; Fisher, J.; Laughton, C.; Allen, S.; Engels, J.; Grasby, J. A.; Neidle, S. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D.

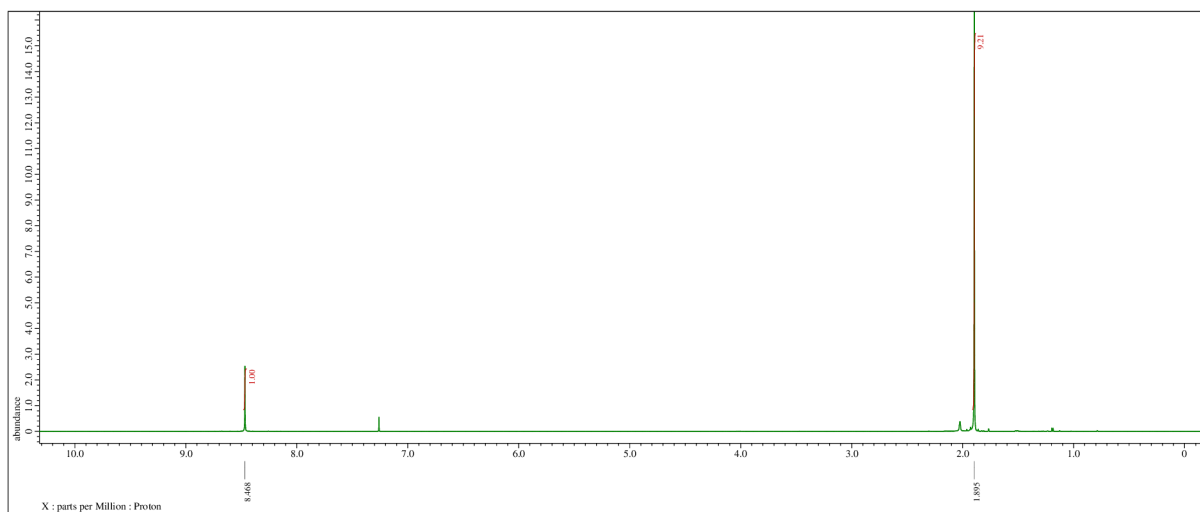
- M., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2006. <https://doi.org/10.1039/9781847555380>.
- (53) Framski, G.; Gdaniec, Z.; Gdaniec, M.; Boryski, J. A Reinvestigated Mechanism of Ribosylation of Adenine under Silylating Conditions. *Tetrahedron* **2006**, *62* (43), 10123–10129. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.046>.
- (54) 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>.
- (55) Marcelo, F.; Silva, F. V. M.; Goulart, M.; Justino, J.; Sinaÿ, P.; Blériot, Y.; Rauter, A. P. Synthesis of Novel Purine Nucleosides towards a Selective Inhibition of Human Butyrylcholinesterase. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (14), 5106–5116. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.057>.
- (56) 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. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (26), 9207–9212. <https://doi.org/10.1021/jo9617023>.
- (57) Garner, P.; Yoo, J. U.; Sarabu, R. Synthesis of 2-Aminopurine Nucleosides via Regiocontrolled Glycosylation. *Tetrahedron* **1992**, *48* (21), 4259–4270. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80438-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80438-5).
- (58) Garner, P.; Ramakanth, S. A Regiocontrolled Synthesis of N7- and N9-Guanine Nucleosides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (6), 1294–1298. <https://doi.org/10.1021/jo00241a032>.
- (59) Tranová, L.; Stýskala, J. Study of the N7Regioselective Glycosylation of 6-Chloropurine and 2,6-Dichloropurine with Tin and Titanium Tetrachloride. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (19), 13265–13275. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01186>.
- (60) Nevrlka, F. Syntéza Purinových Derivátů Obsahujících v Poloze N7 Terc-Butylovou Skupinu. *Bakalářská práce, Přf, UP Olomouc* **2021**.
- (61) Oumata, N.; Ferandin, Y.; Meijer, L.; Galons, H. Practical Synthesis of Roscovitine and CR8. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (3), 641–644. <https://doi.org/10.1021/op800284k>.

7 Přílohy

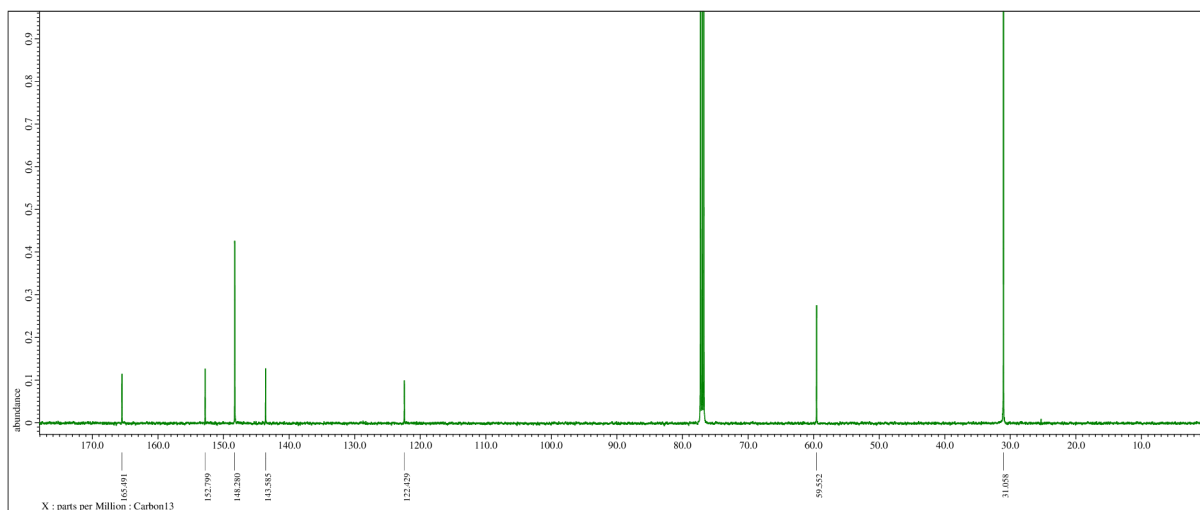
7-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-7*H*-purin (2)



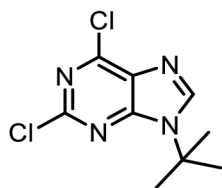
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.47 (s, 1H), 1.90 (s, 9H)



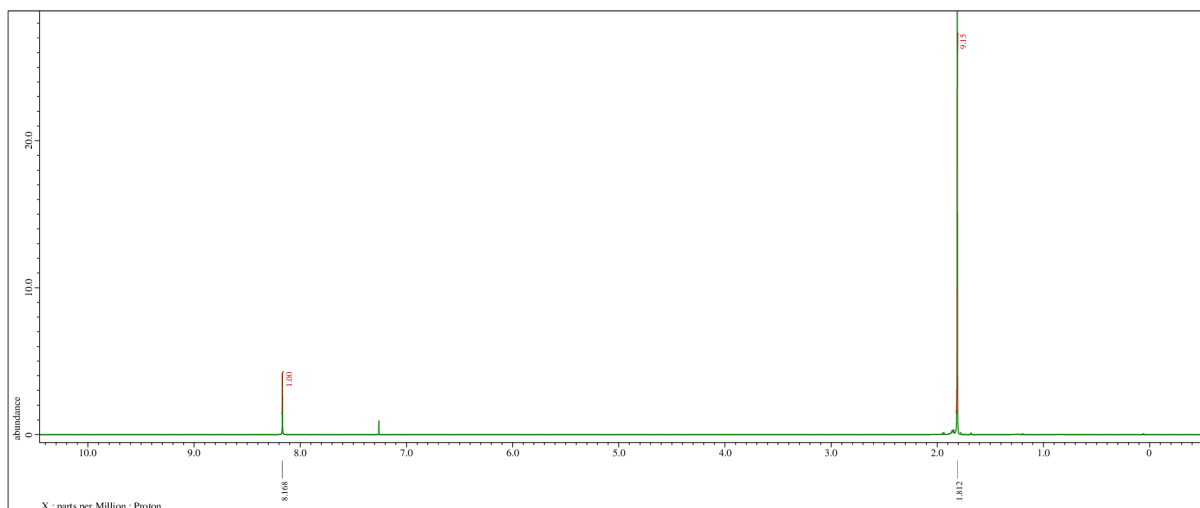
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 165.5, 152.8, 148.3, 143.6, 122.4, 59.6, 31.1



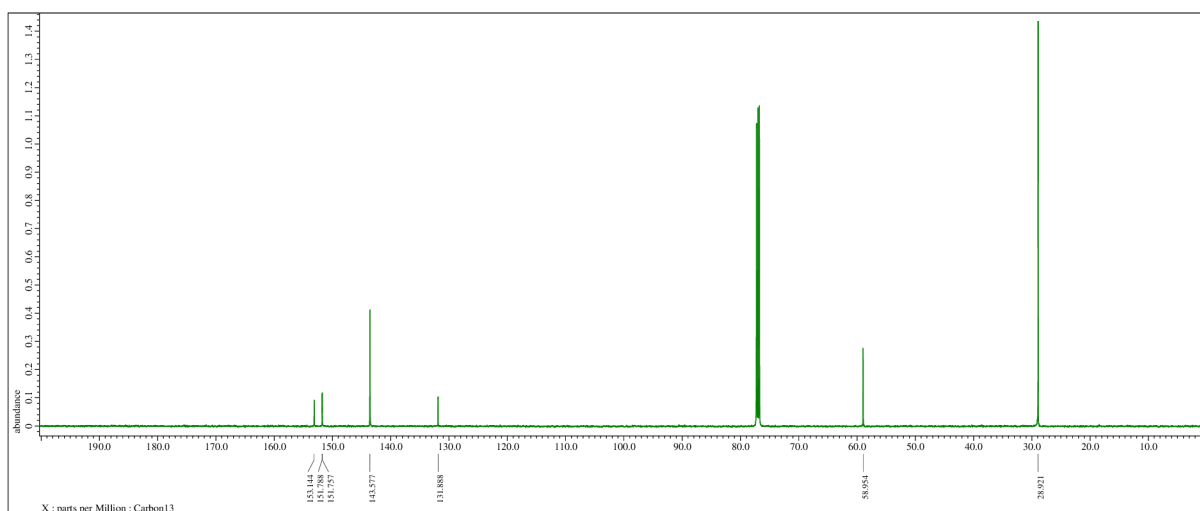
9-(*Terc*-butyl)-2,6-dichlor-9*H*-purin (**3**)



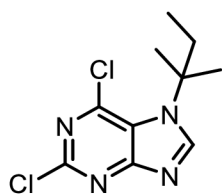
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.17 (s, 1H), 1.81 (s, 9H)



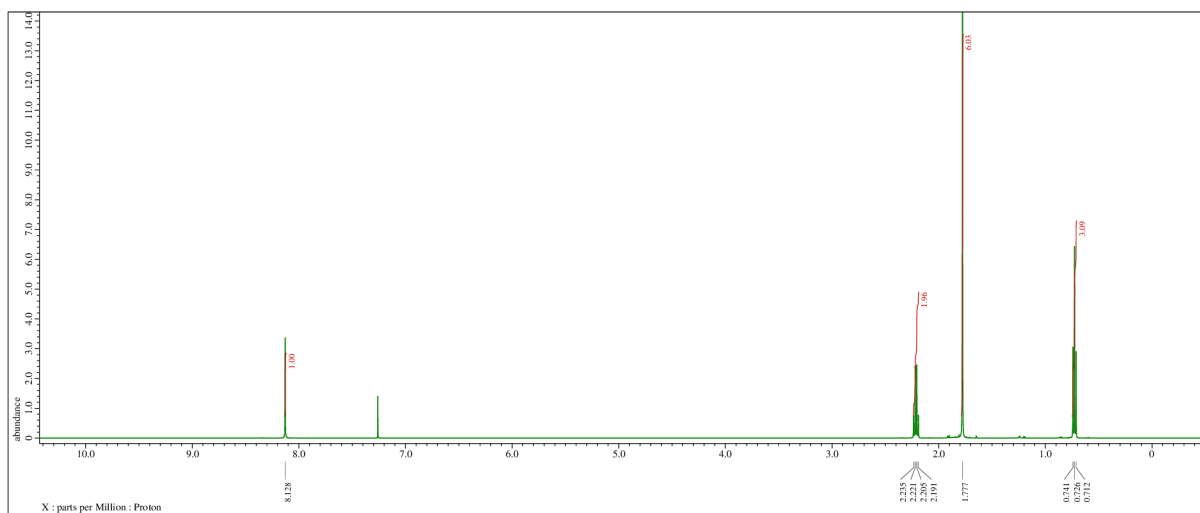
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 153.1, 151.79, 151.76; 143.6, 131.9, 59.0, 28.9



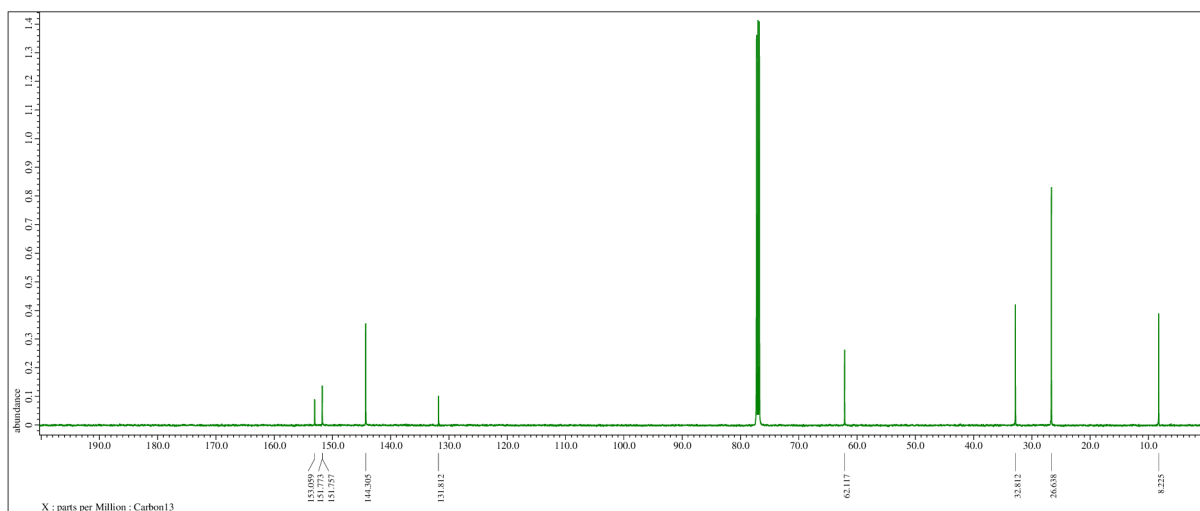
2,6-Dichlor-7-(*terc*-pentyl)-7*H*-purin (**4**)



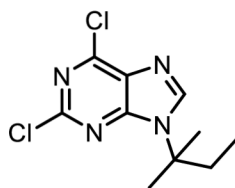
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.13 (s, 1H), 2.21 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.78 (s, 6H), 0.73 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)



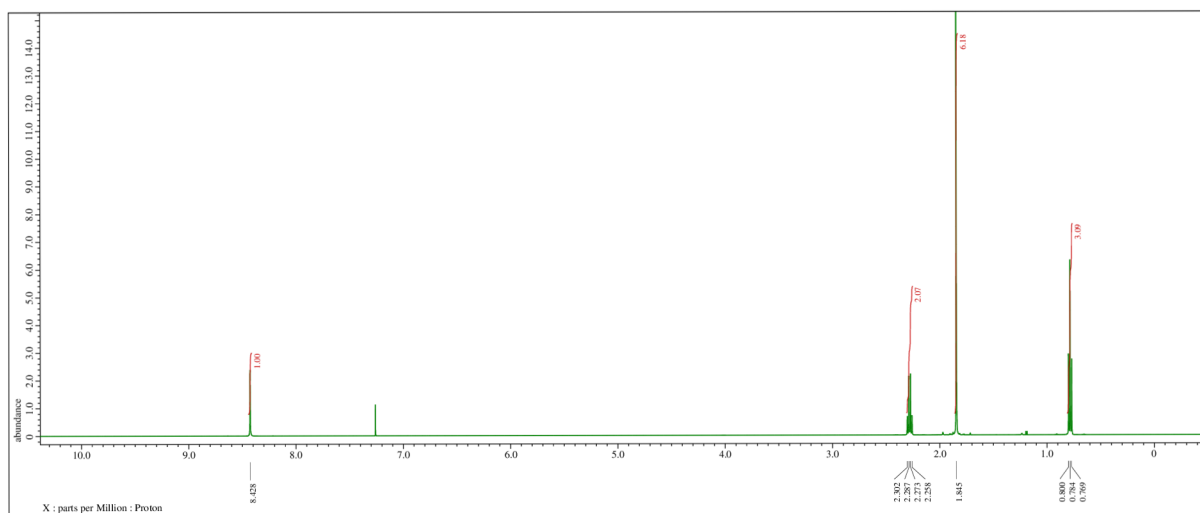
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 153.1, C 151.77, 151.76; 144.3, 131.8, 62.1, 32.8, 26.6, 8.2



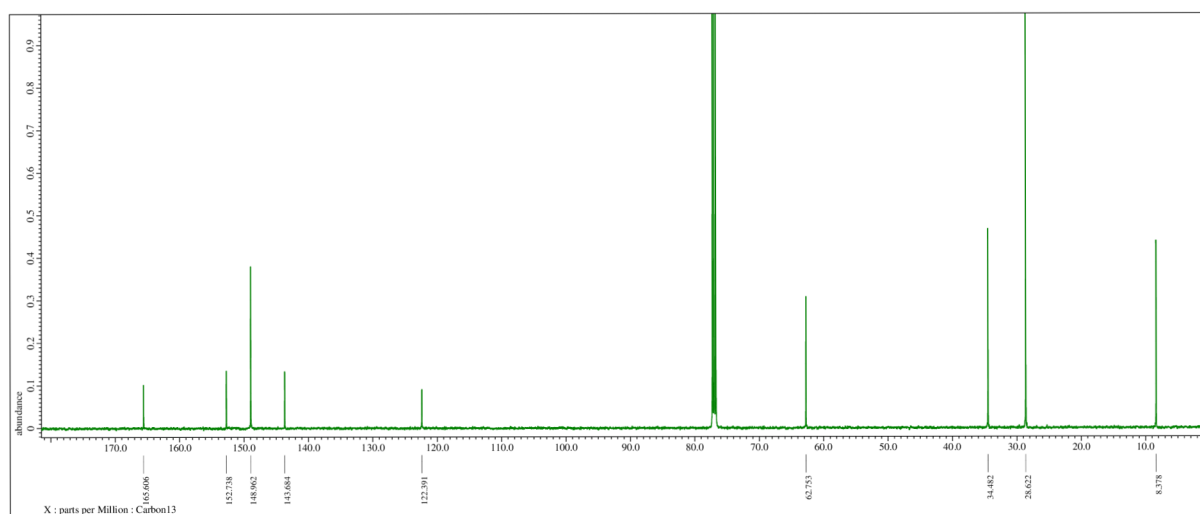
2,6-Dichlor-9-(*terc*-pentyl)-9*H*-purin (**5**)



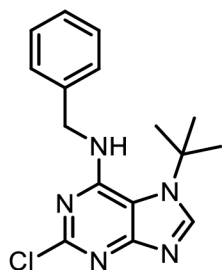
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.43 (s, 1H), 2.28 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.85 (s, 6H), 0.78 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)



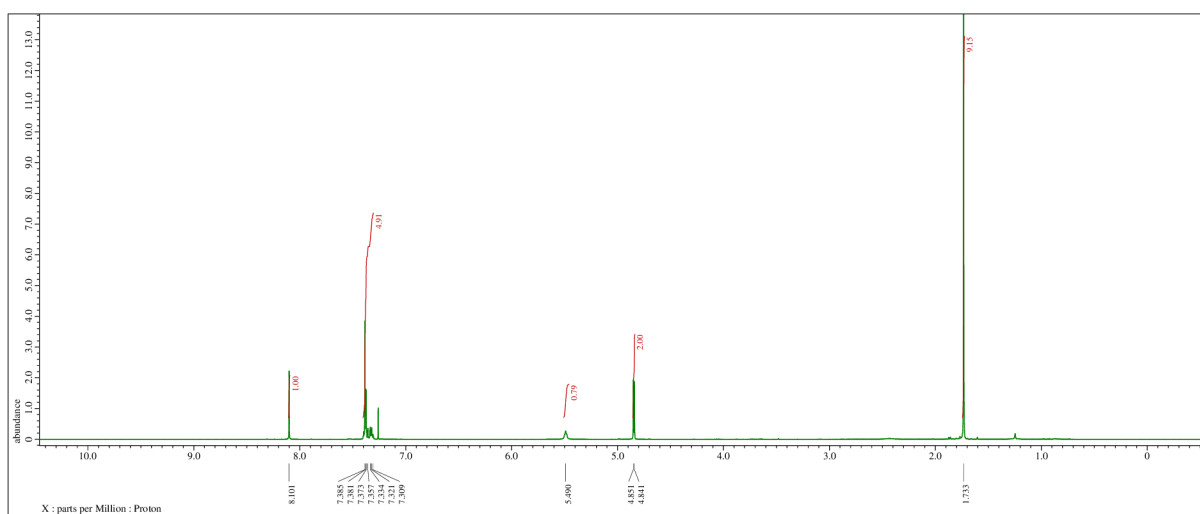
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 165.6, 152.7, 149.0, 143.7, 122.4, 62.8, 34.5, 28.6, 8.4



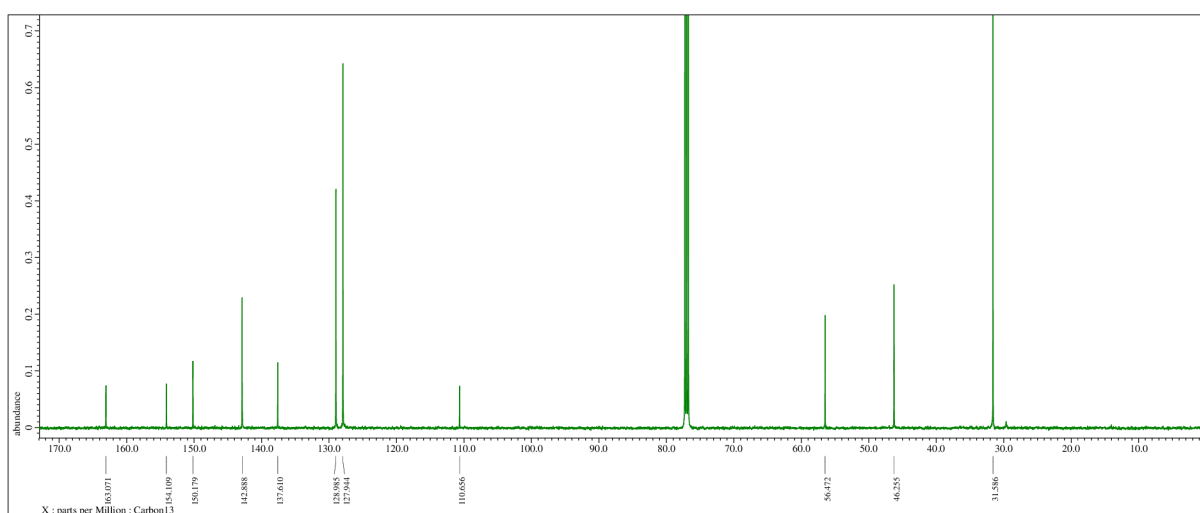
N-Benzyl-7-(*tert*-butyl)-2-chlor-7*H*-purin-6-amin (**6**)



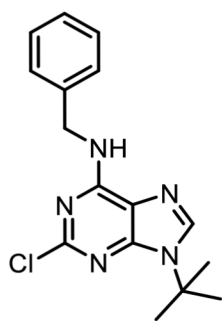
¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.10 (s, 1H), 7.39-7.31 (m, 5H), 5.49 (bs, 1H), 4.85 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.73 (s, 9H)



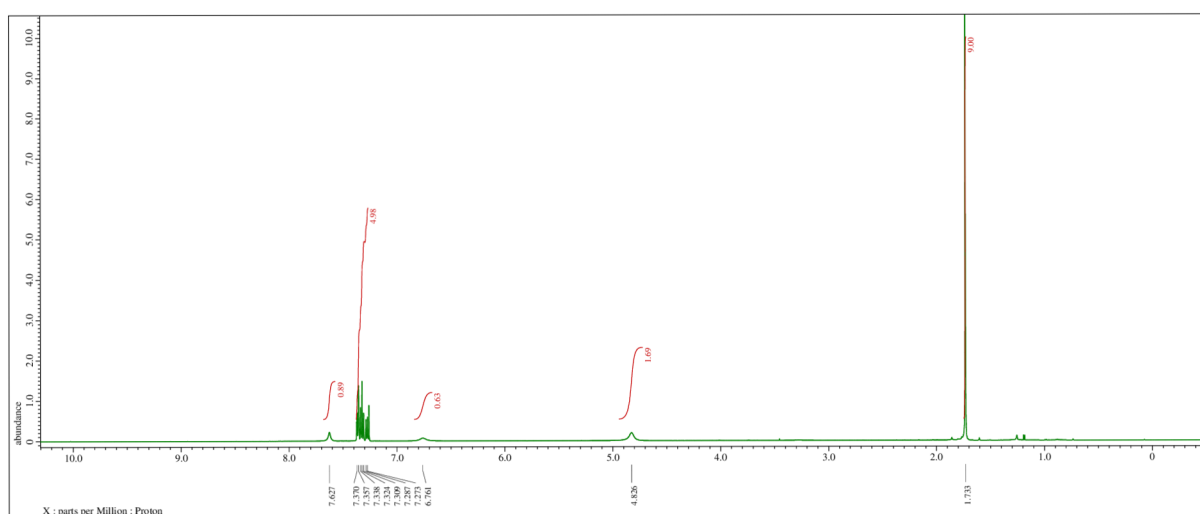
¹³C-NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.1, 154.1, 150.2, 142.9, 137.6, 129.0, nejpravděpodobněji 2x C 127.9, 110.7, 56.5, 46.3, 31.6



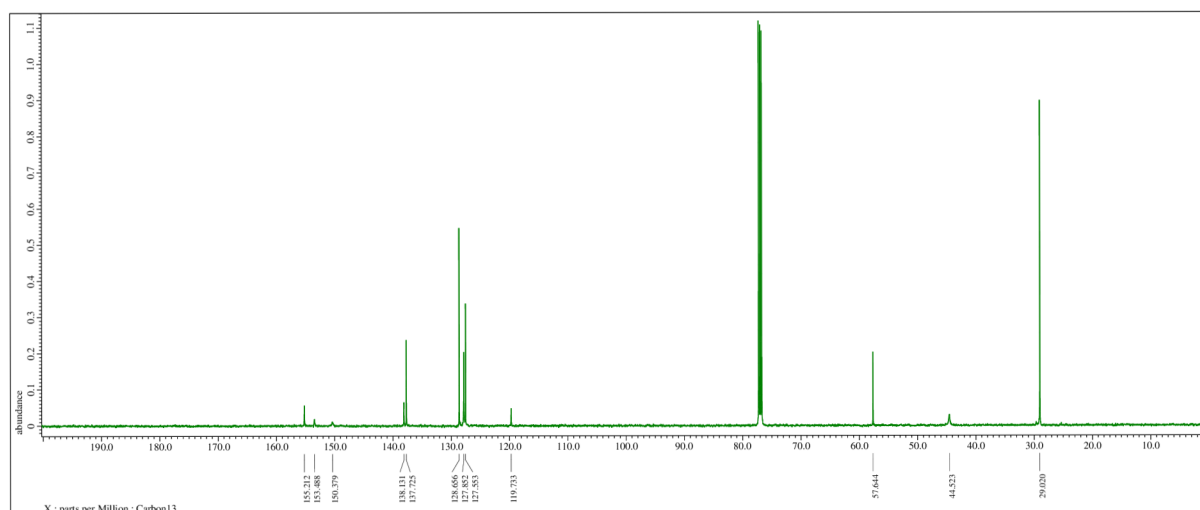
N-Benzyl-9-(*tert*-butyl)-2-chlor-9*H*-purin-6-amin (7)



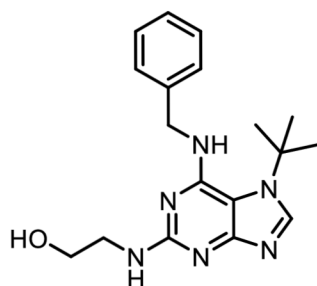
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.63 (s, 1H), 7.37-7.27 (m, 5H), 6.76 (bs, 1H), 4.83 (bs, 2H), 1.73 (s, 9H)



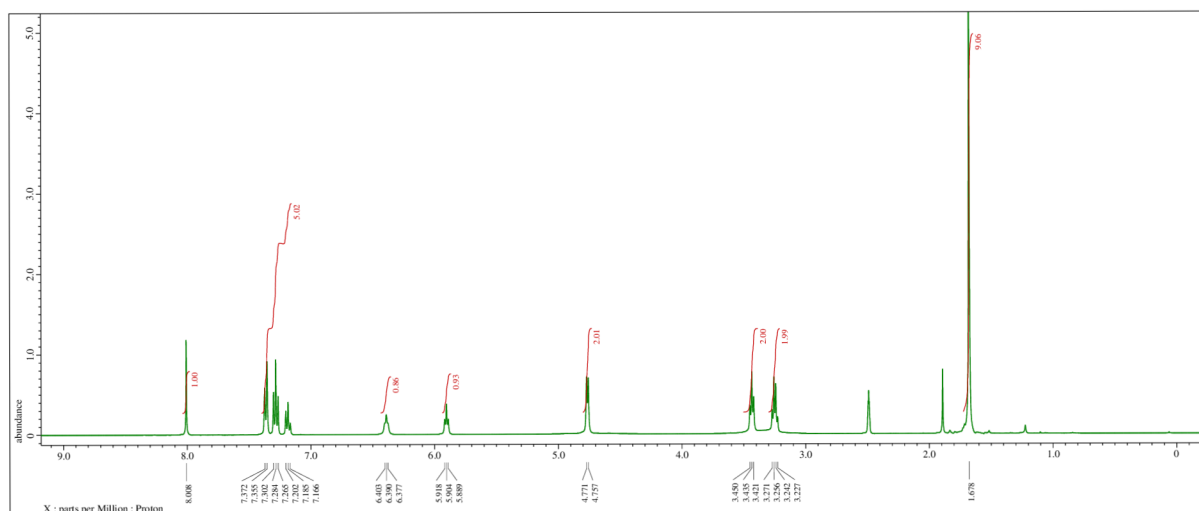
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 155.2, 153.5, 150.4, 138.1, 137.7, 128.7, 127.9, 127.6, 119.7, 57.6, 44.5, 29.0



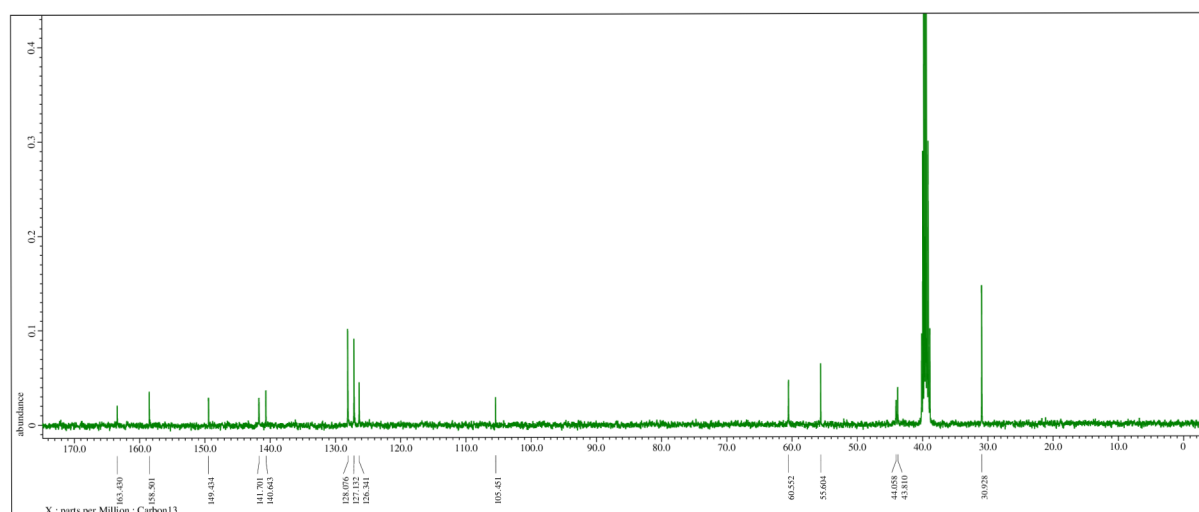
2-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**8**)



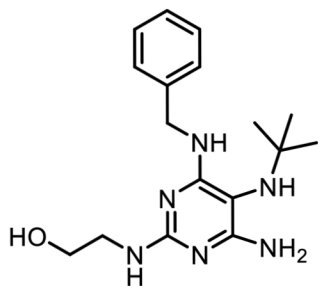
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.01 (s, 1H), 7.37-7.17 (m, 5H), 6.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.90 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.44 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.25 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 1.68 (s, 9H)



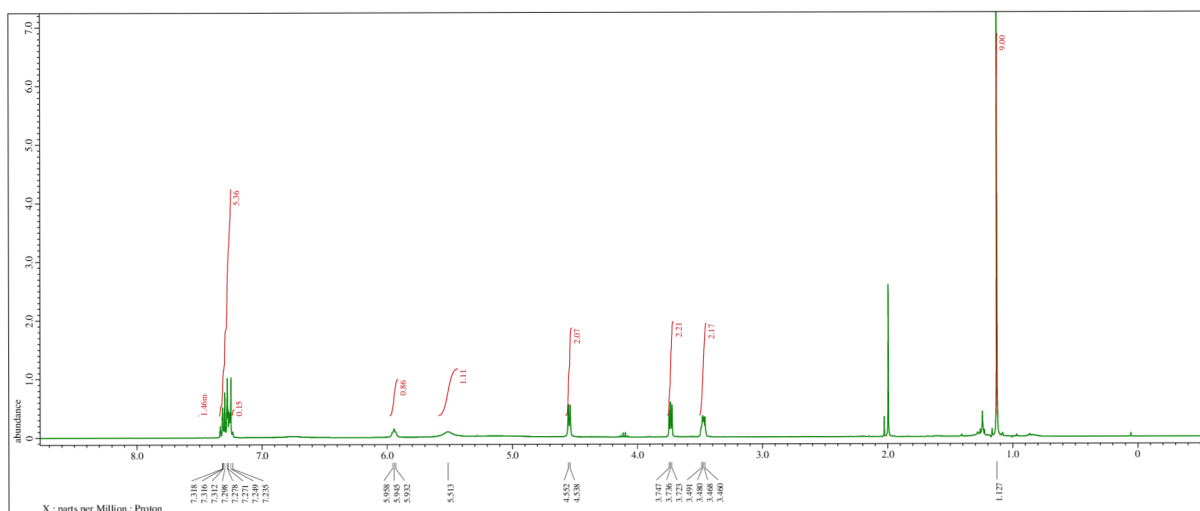
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.4, 158.5, 149.4, 141.7, 140.6, 128.1, 127.1, 126.3, 105.5, 60.6, 55.6, 44.1, 43.8, 30.9



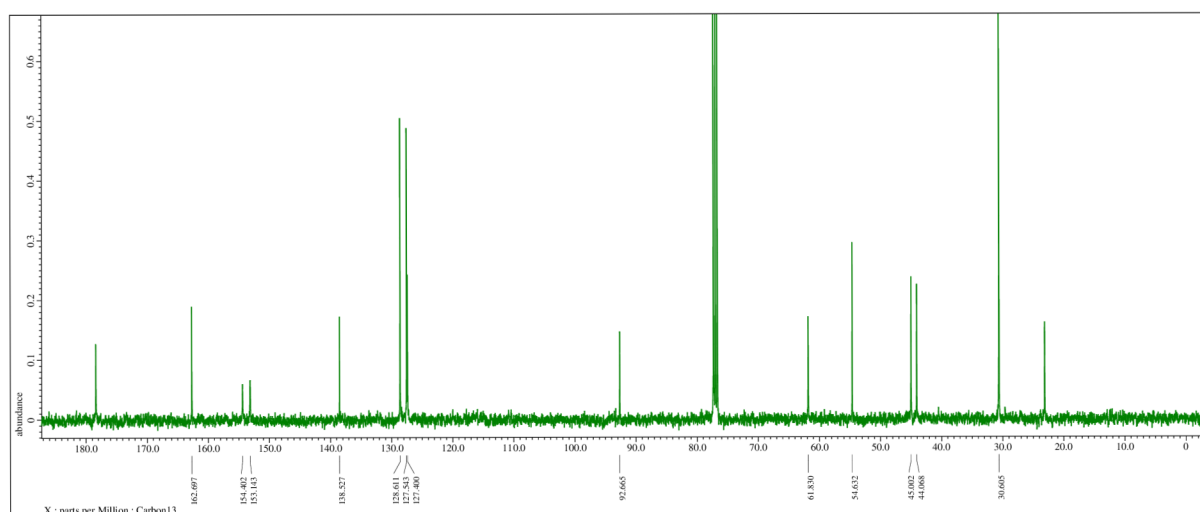
2-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**9**)



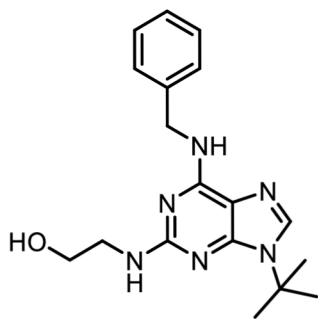
¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.32-7.25 (m, 5H), 5.94 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.51 (bs, 1H), 4.55 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.47 (q, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.13 (s, 9H)



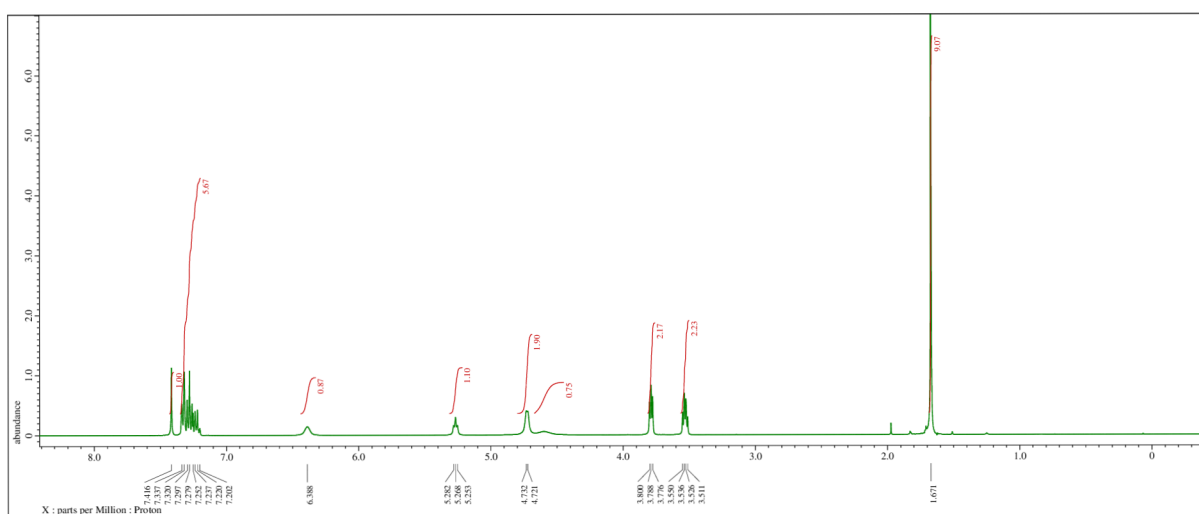
¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 162.7, 154.4, 153.1, 138.5, 128.6, 127.5, 127.4, 92.7, 61.8, 54.6, 45.0, 44.1, 30.6



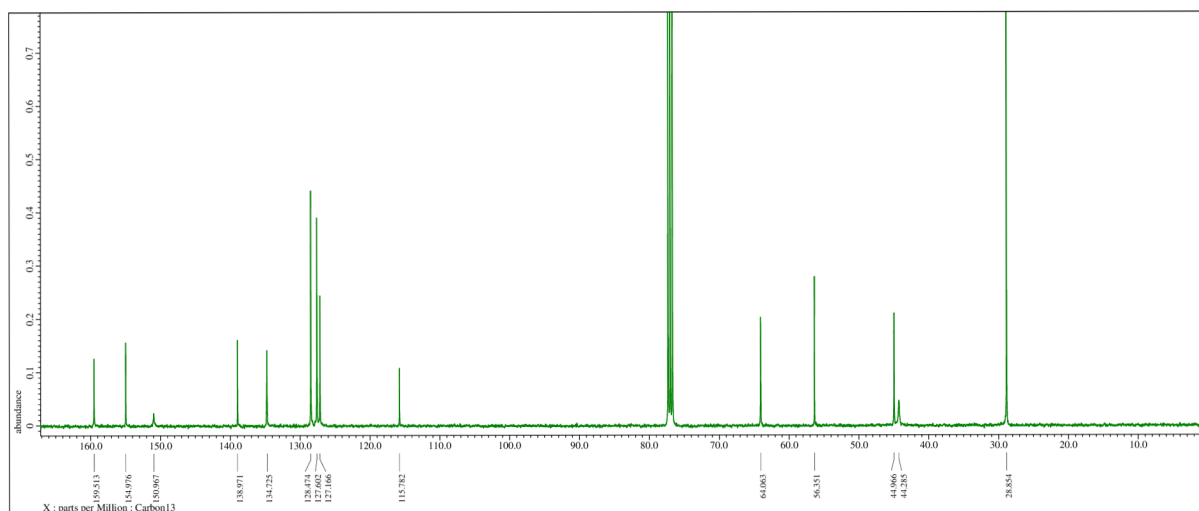
2-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9H-purin-2-yl)amino)ethan-1-ol (**10**)



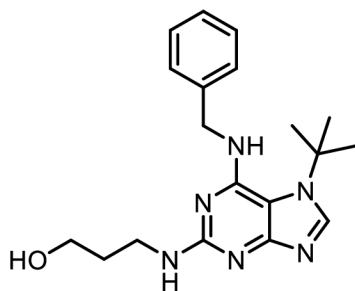
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 7.42 (s, 1H), 7.34-7.20 (m, 5H), 6.39 (bs, 1H), 5.27 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 4.45-4.67 (bs, 1H), 3.79 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.53 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.67 (s, 9H)



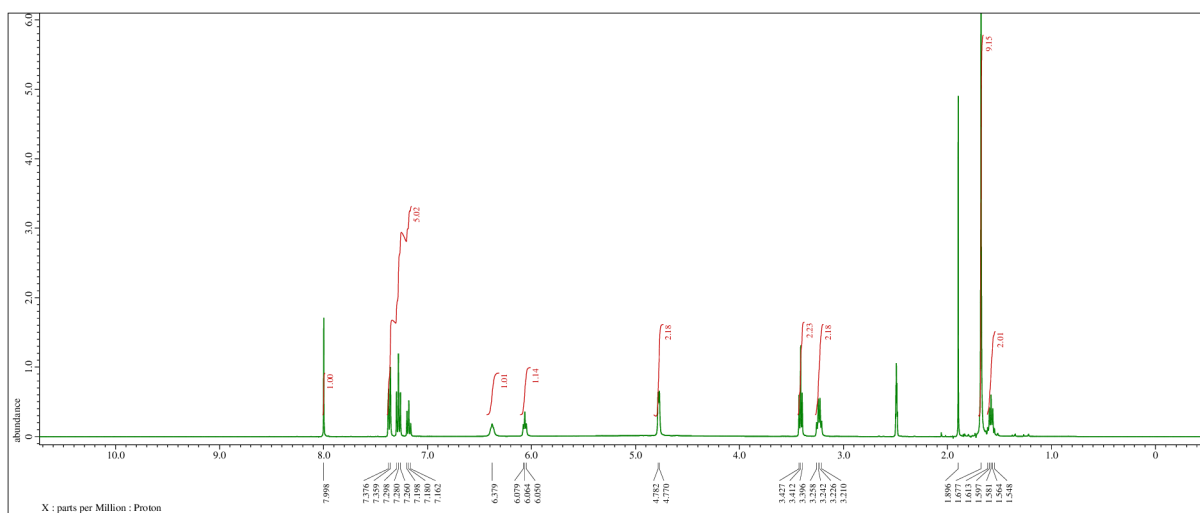
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 159.5, 155.0, 151.0, 139.0, 134.7, 128.5, 127.6, 127.2, 115.8, 64.1, 56.4, 45.0, 44.3, 28.9



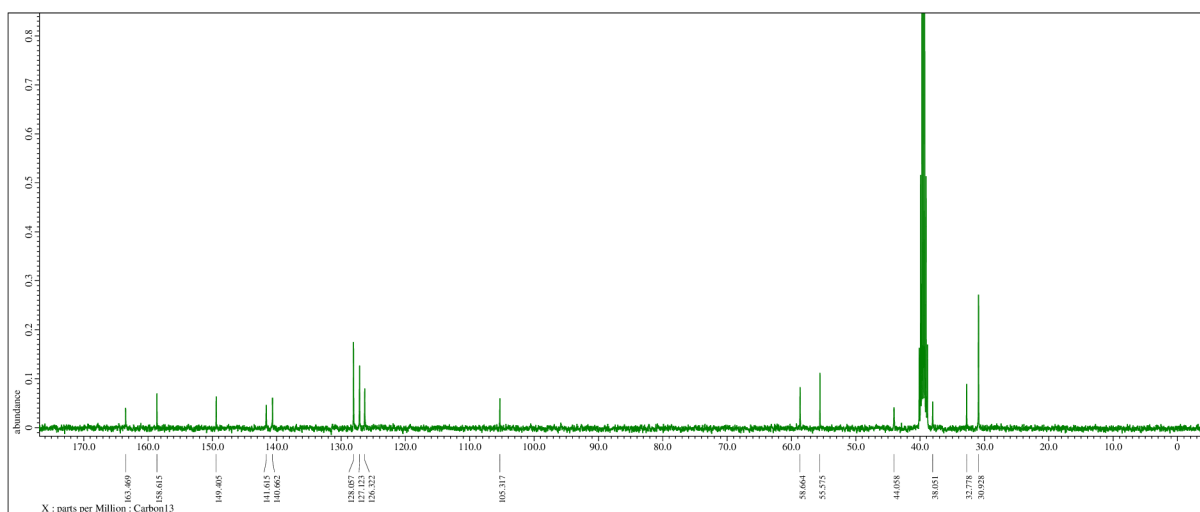
3-((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**11**)



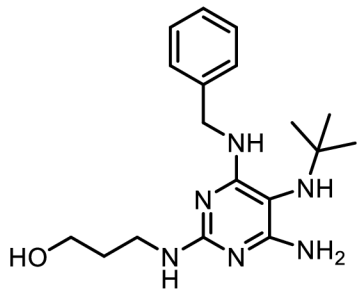
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.00 (s, 1H), 7.38-7.16 (m, 5H), 6.38 (bs, 1H), 6.06 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.23 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.68 (s, 9H), 1.58 (quin, $J = 6.4$ Hz, 2H)



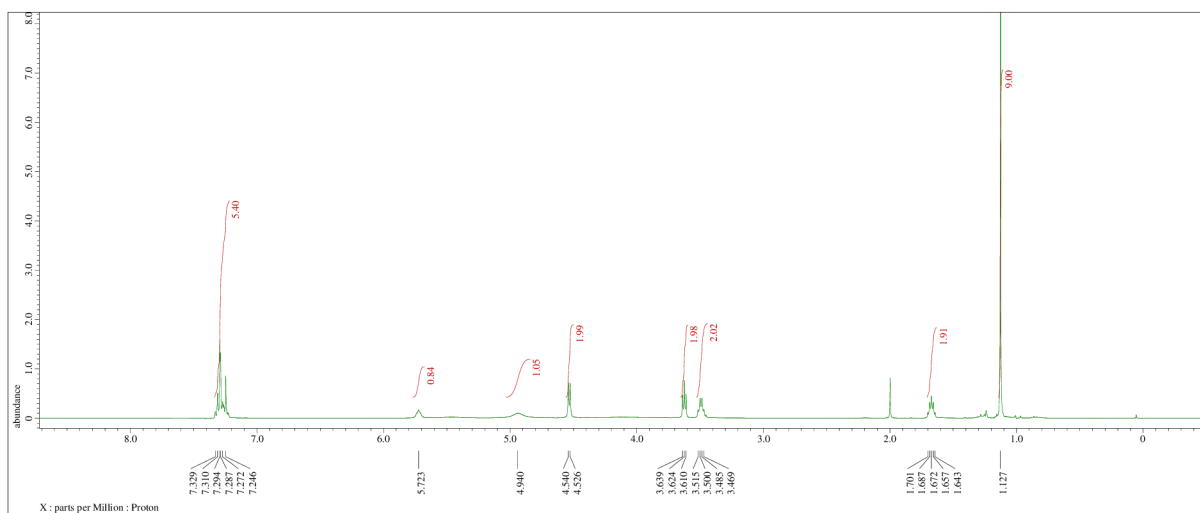
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.5, 158.6, 149.4, 141.6, 140.7, 128.1, 127.1, 126.3, 105.3, 58.7, 55.6, 44.1, 38.1, 32.8, 30.9



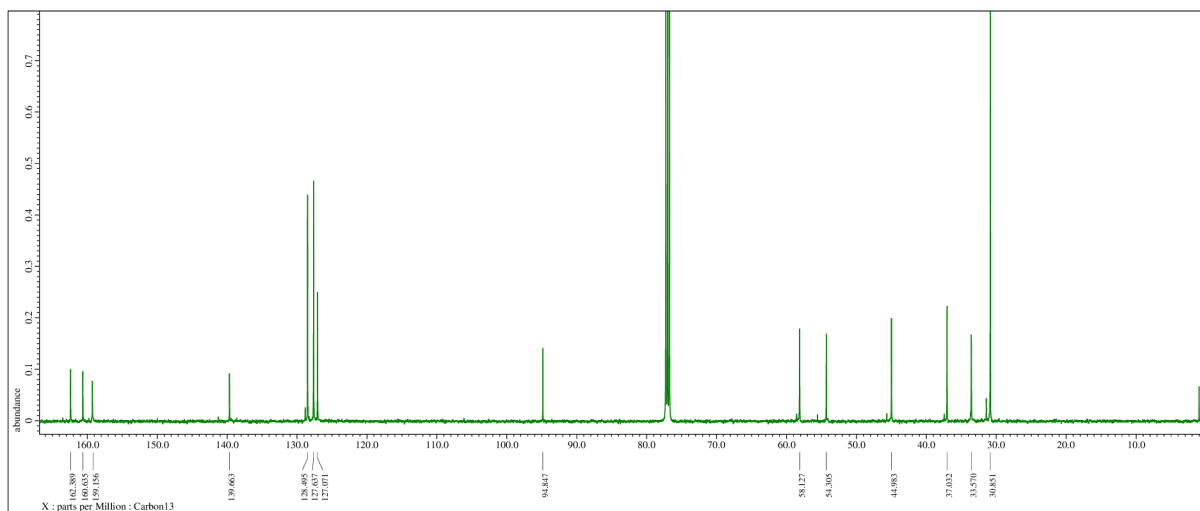
3-((4-Amino-6-(benzylamino)-5-(*tert*-butylamino)pyrimidin-2-yl)amino)propan-1-ol
(12)



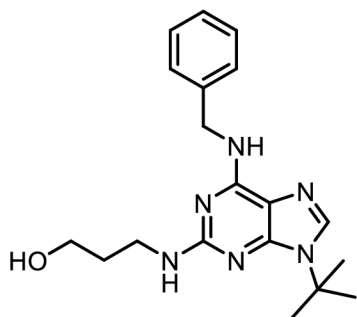
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 7.33-7.25 (m, 5H), 5.72 (bs, 1H), 4.94 (bs, 1H), 4.53 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.49 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.67 (quin, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.13 (s, 9H)



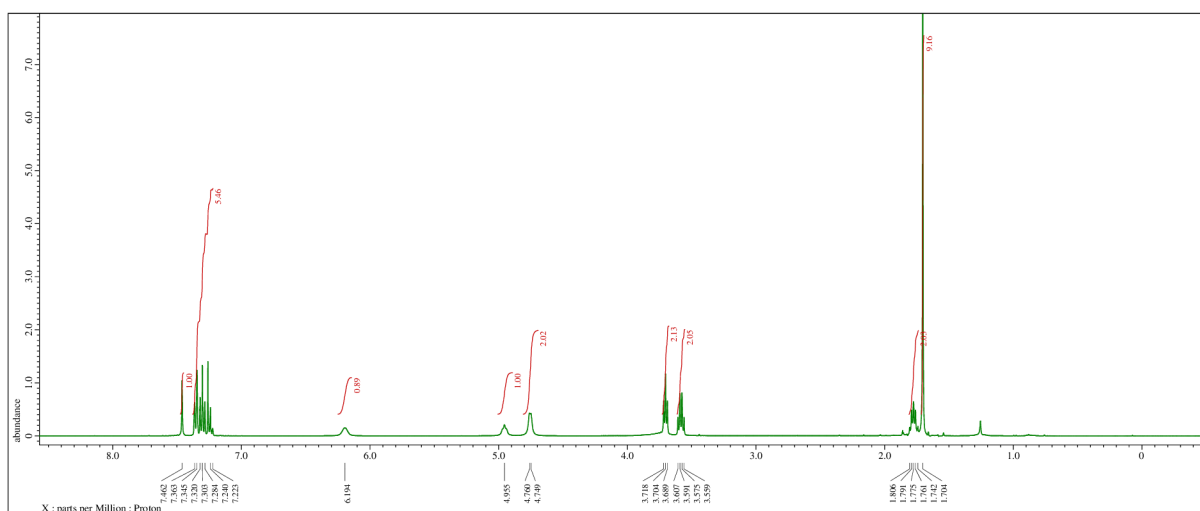
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 162.4, 160.6, 159.2, 139.7, 128.5, 127.6, 127.1, 94.8, 58.1, 54.3, 45.0, 37.0, 33.6, 30.9



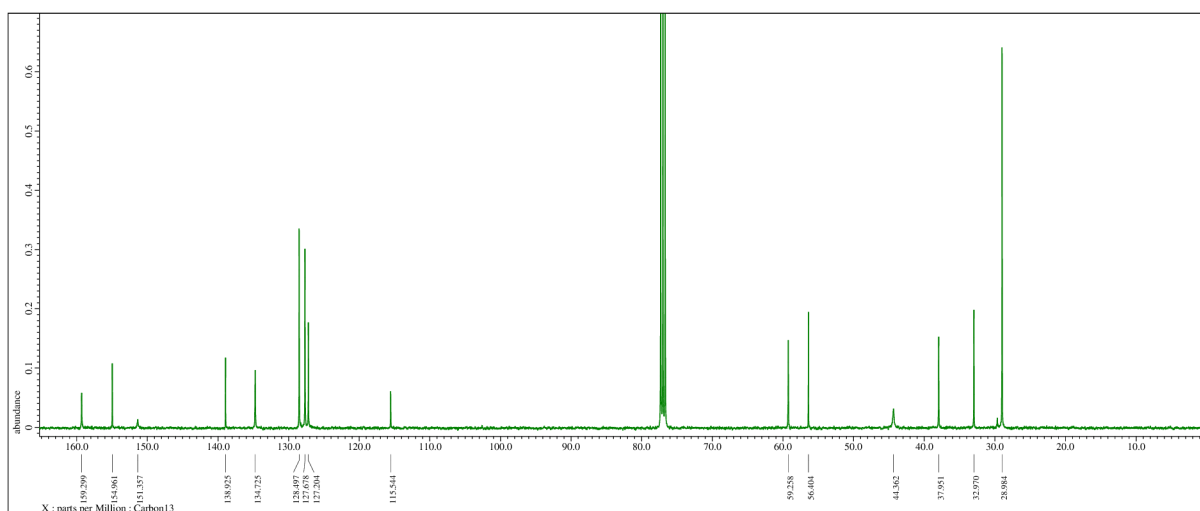
3-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9H-purin-2-yl)amino)propan-1-ol (**13**)



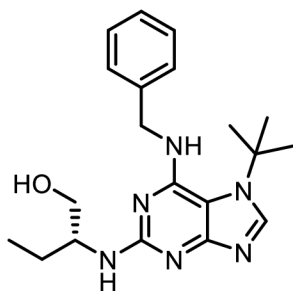
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 7.46 (s, 1H), 7.36-7.22 (m, 5H), 6.19 (bs, 1H), 4.95 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.75 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.58 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.78 (quin, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.70 (s, 9H)



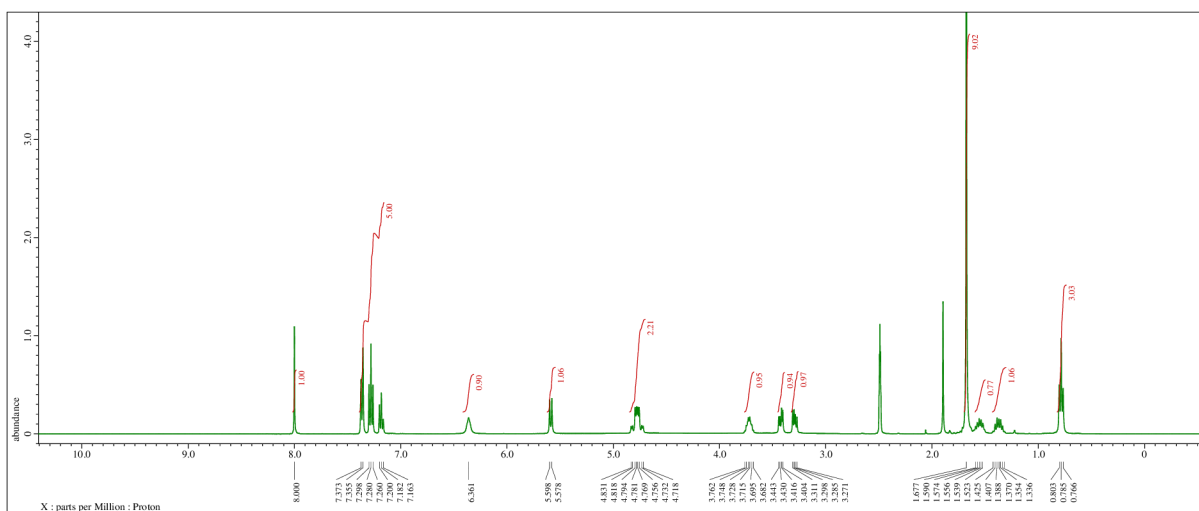
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 159.3, 155.0, 151.4, 138.9, 134.7, 128.5, 127.7, 127.2, 115.5, 59.3, 56.4, 44.4, 38.0, 33.0, 29.0



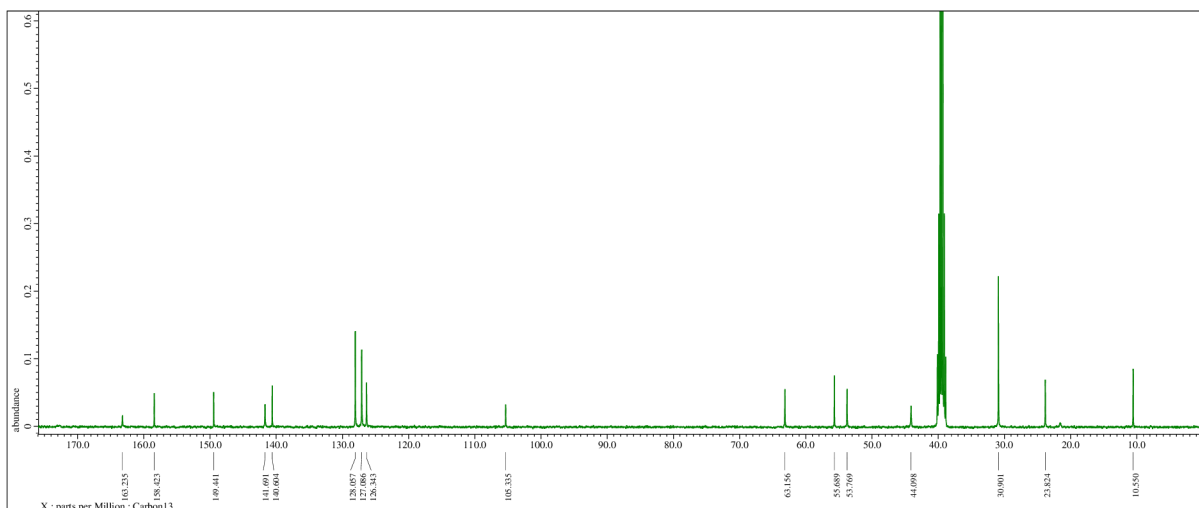
(*R*)-2-(((6-(Benzylamino)-7-(*tert*-butyl)-7*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol) (**14**)



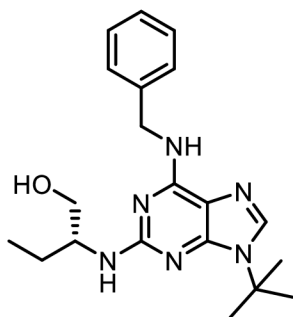
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.00 (s, 1H), 7.37-7.16 (m, 5H), 6.36 (bs, 1H), 5.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.77 (ddd, $J = 24.9, 15.0, 5.3$ Hz, 2H), 3.72 (td, $J = 13.3, 5.4$ Hz, 1H), 3.42 (dd, $J = 10.5, 4.7$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 10.5, 5.6$ Hz, 1H), 1.68 (s, 9H), 1.59-1.52 (m, 1H), 1.43-1.32 (m, 1H), 0.78 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)



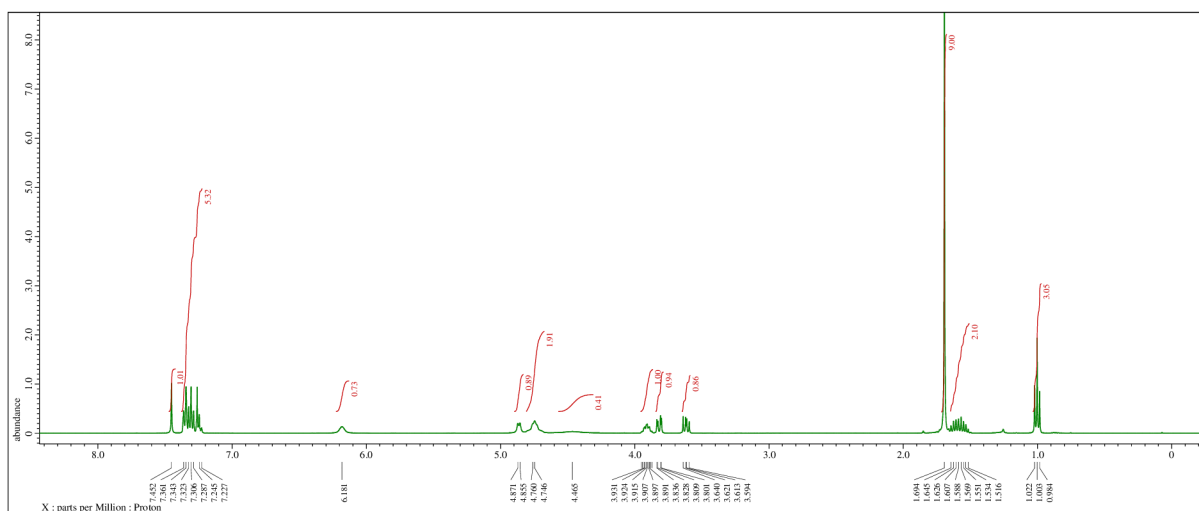
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.2, 158.4, 149.4, 141.7, 140.6, 128.1, 127.1, 126.3, 105.3, 63.2, 55.7, 53.8, 44.1, 30.9, 23.8, 10.5



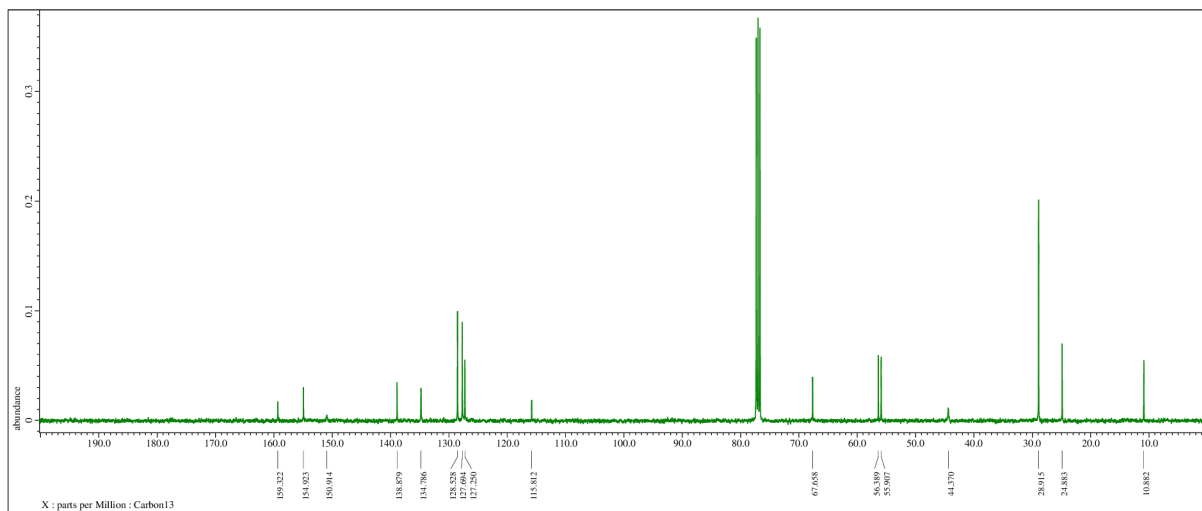
(*R*)-2-((6-(Benzylamino)-9-(*tert*-butyl)-9*H*-purin-2-yl)amino)butan-1-ol (**15**)



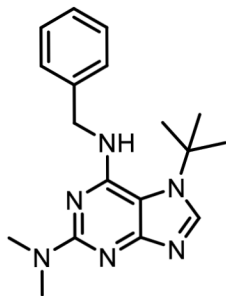
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ 7.45 (s, 1H), 7.36-7.23 (m, 5H), 6.18 (bs, 1H), 4.87 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.78-4.68 (m, 2H), 4.44 (bs, 1H), 3.89 (quind, $J = 7.0, 3.1$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 10.7, 3.1$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 10.7, 7.6$ Hz, 1H), 1.69 (s, 9H), 1.58 (dekaplet, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)



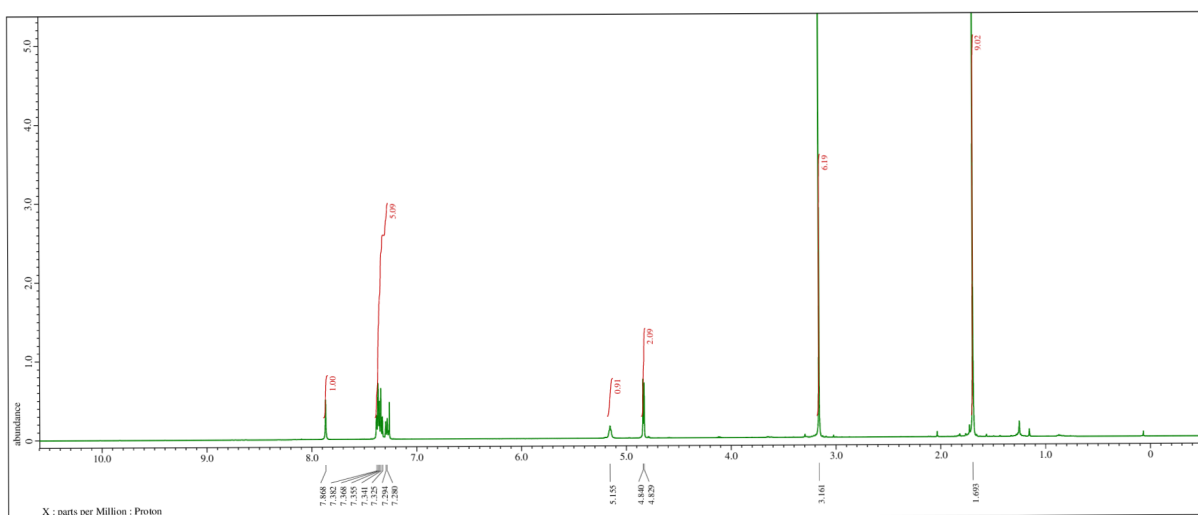
^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 159.3, 154.9, 150.9, 138.9, 134.8, 128.5, 127.7, 127.3, 115.8, 67.7, 56.4, 55.9, 44.4, 28.9, 24.9, 10.9



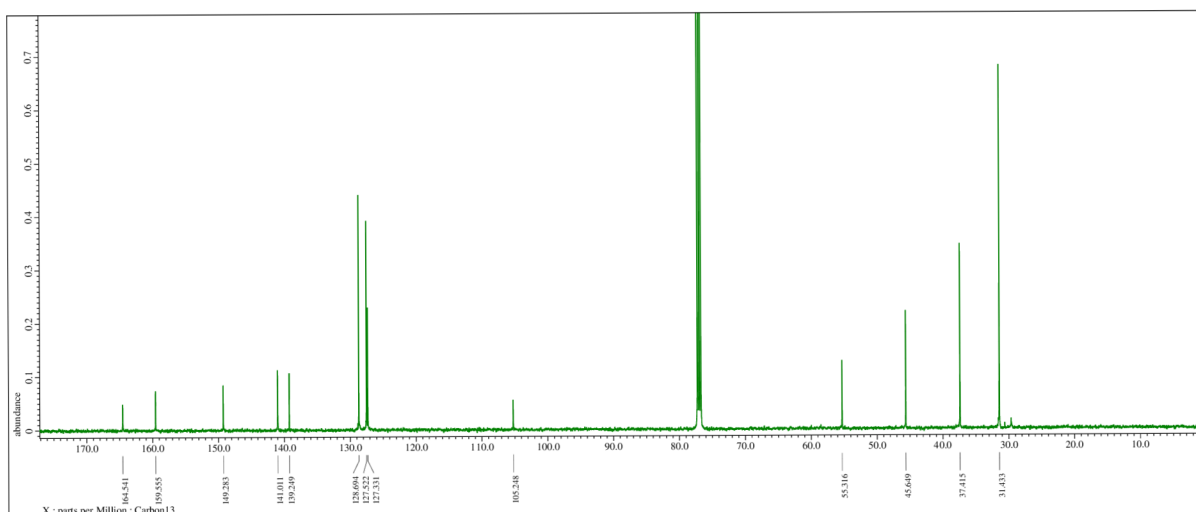
N^6 -Benzyl-7-(*tert*-butyl)- N^2 , N^2 -dimethyl-7*H*-purin-2,6-diamin (**16**)



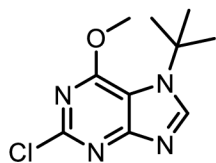
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.87 (s, 1H), 7.38-7.28 (m, 5H), 5.15 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.16 (s, 6H), 1.69 (s, 9H)



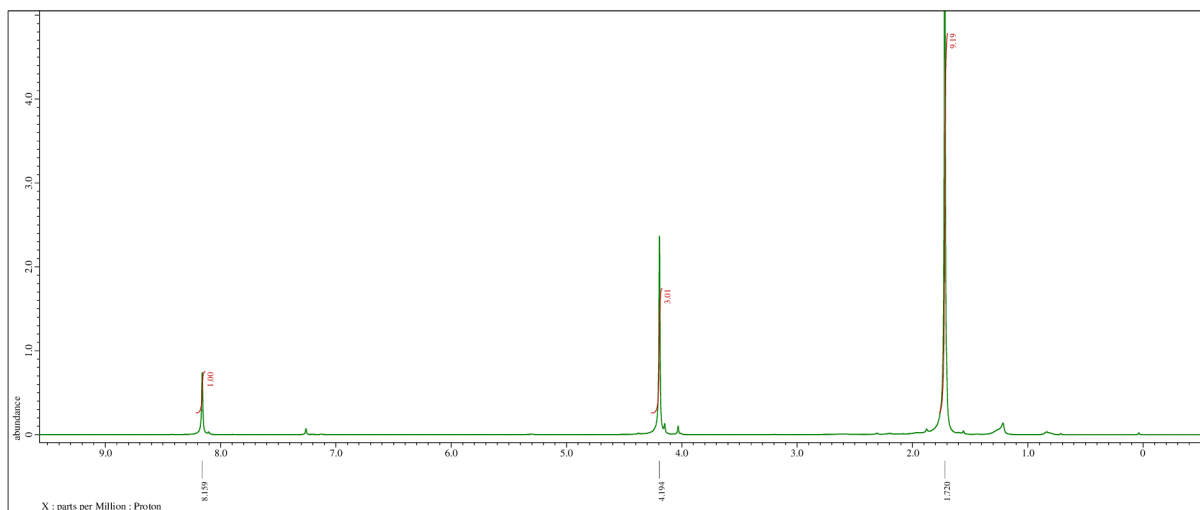
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 164.5, 159.6, 149.3, 141.0, 139.2, 128.7, 127.5, 127.3, 105.2, 55.3, 45.6, 37.4, 31.4



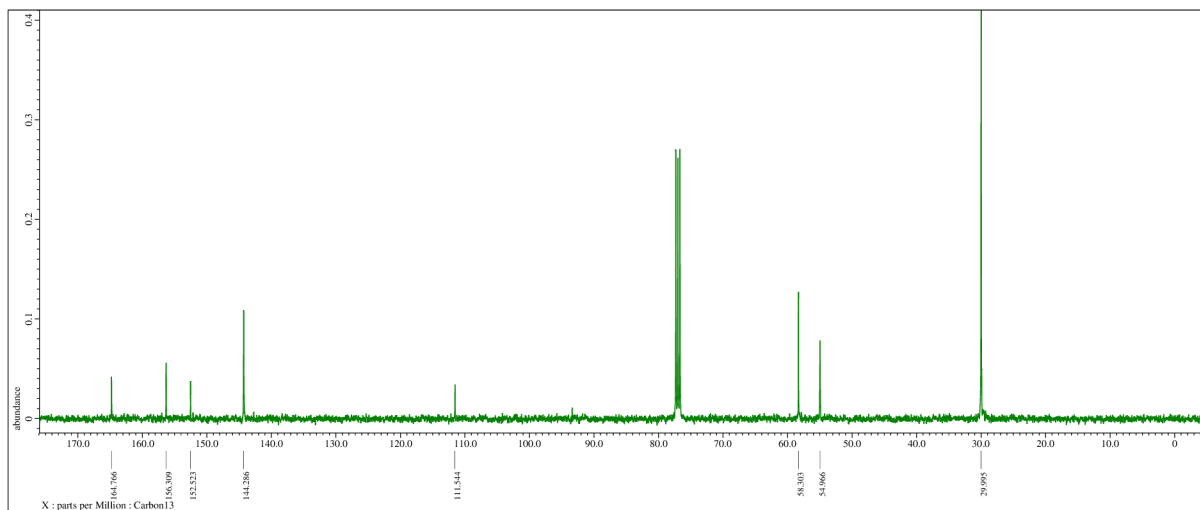
7-(*Terc*-butyl)-2-chlor-6-methoxy-7*H*-purin (**17**)



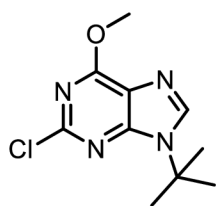
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.16 (s, 1H), 4.19 (s, 3H), 1.72 (s, 9H)



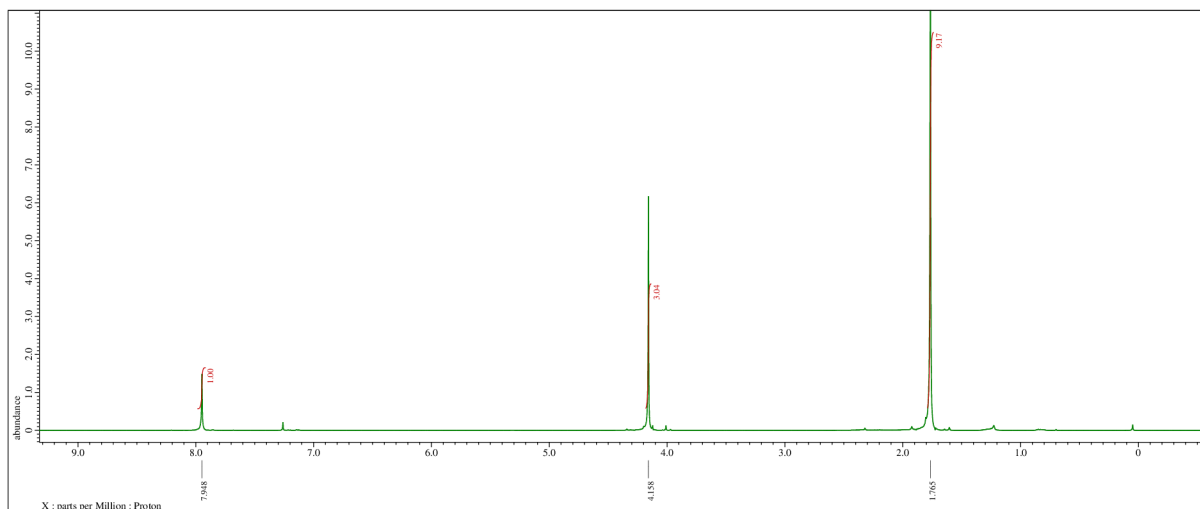
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 164.8, 156.3, 152.5, 144.3, 111.5, 58.3, 55.0, 30.0



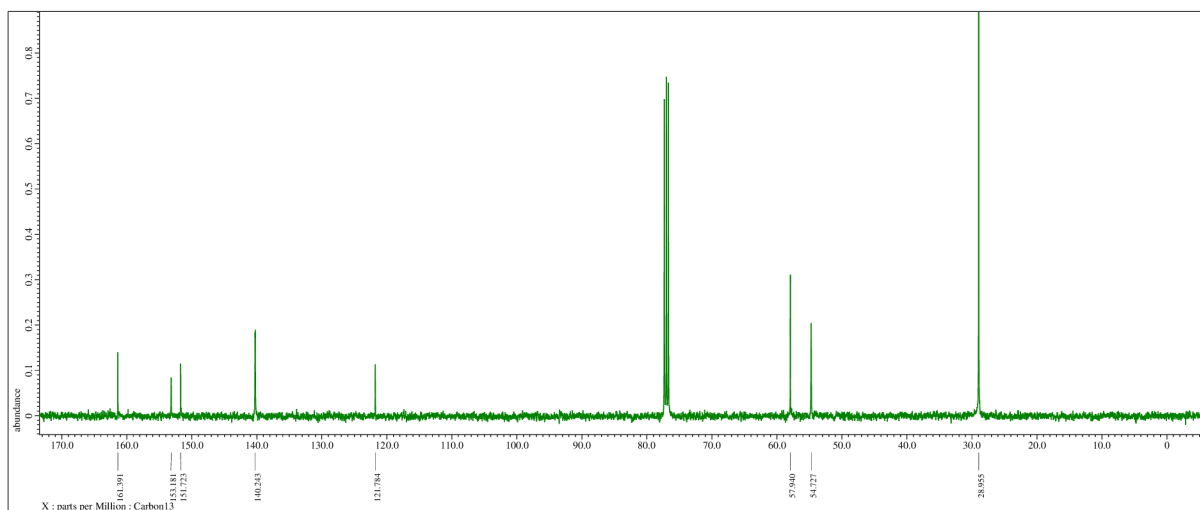
9-(*Terc*-butyl)-2-chlor-6-methoxy-9*H*-purin (**18**)



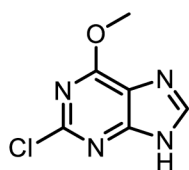
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 7.95 (s, 1H), 4.16 (s, 3H), 1.77 (s, 9H)



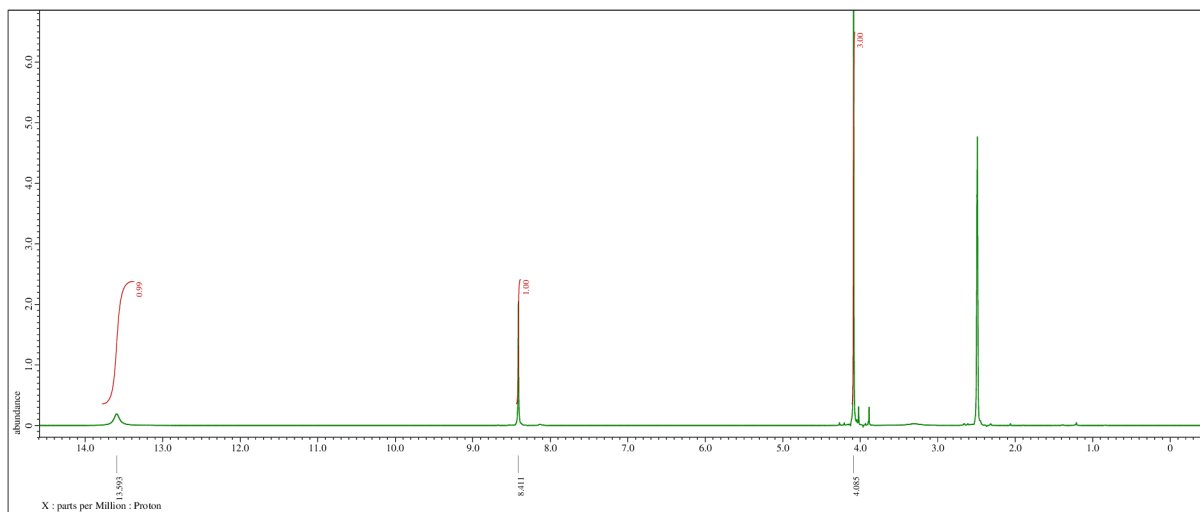
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 161.4, 153.2, 151.7, 140.2, 121.8, 57.9, 54.7, 29.0



2-Chlor-6-methoxy-9H-purin (**19**)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.59 (bs, 1H), 8.41 (s, 1H), 4.08 (s, 3H)



NOESY NMR spektrum sloučeniny 7-(*Terc*-butyl)-2-chlor-6-methoxy-7*H*-purin (**17**)

