

Mikrovlnami asistovaná syntéza biologicky aktivních látek na bázi 6,9-disubstituovaných purinů

Bc. Radim Velecký

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Radim Velecký**
Osobní číslo: **T18293**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Mikrovlnami asistovaná syntéza biologicky aktivních látek na bázi 6,9-disubstituovaných purinů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Možnosti mikrovlnami asistované syntézy purinových sloučenin.
2. Biologická aktivita 6,9-disubstituovaných purinů.

II. Praktická část

1. Provést alkylaci na N9 purinového skeletu.
2. Pomocí mikrovlnami asistované syntézy substitutovat atom chloru na C6 různými aromatickými aminy.
3. Připravené sloučeniny charakterizovat pomocí spektrálních metod.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

[1] MANVAR, A., SHAH, A.: Microwave-assisted chemistry of purines and xanthines. An overview. *Tetrahedron*, 2013, 69, 8105-8127.

[2] WANG, X., HAN, C., WU, K., LUO, L., WANG, Y., DU, X., HE, Q., YE, F.: Design, synthesis and ability of non-gold complexed substituted purine derivatives to inhibit LPS-induced inflammatory response. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 149, 10-21.

[3] ABDOLI, M., MIRJAFARY, Z., SAEDIAN, H., KAKANEJADIFARD, A.: New developments in direct functionalization of C-H and N-H bonds of purine bases via metal catalyzed cross-coupling reactions. *RSC Advances*, 2015, 5, 44371-44389.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Nové purinové deriváty jsou ve velké míře připravovány nejen z důvodu širokých možností substituce purinového skeletu v polohách 2, 6, 8 a 9, ale také se záměrem studovat jejich možnou biologickou aktivitu. Tato diplomová práce popisuje syntézu 6,9-disubstituovaných purinů s doposud nepopsanou strukturou v literatuře. Alkylací výchozího 6-chlor-9*H*-purinu byly připraveny dvě sloučeniny obsahující v poloze N9 propan-2-yl nebo cyklopentyl. Obě sloučeniny byly podrobeny mikrovlnami asistované nukleofilní aromatické substituci a bylo připraveno celkem 12 nových derivátů purinu, které obsahují v poloze 6 různé aromatické aminy. Všechny připravené látky byly plně charakterizovány pomocí běžně používaných spektrálních metod.

Klíčová slova: purin, alkylace, mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce, spektrální metody, biologická aktivita

ABSTRACT

New series of purine derivatives are extensively synthesized not only due to the wide possibility of purine ring substitution at positions 2, 6, 8 and 9, respectively, but also with the aim to study their potential biological activity. This diploma thesis describes synthesis of 6,9-disubstituted purines, in most of cases with no described structure in the literature up to this day. Alkylation of the starting 6-chloro-9*H*-purine provided two compounds bearing at position N9 propan-2-yl or cyclopentyl, respectively. Both compounds were subsequently subjected to microwave-assisted nucleophilic aromatic substitution and twelve novel derivatives bearing at position 6 different aromatic amines was synthesized. All prepared compounds were fully characterized by commonly used spectral methods.

Keywords: purine, alkylation, microwave-assisted nucleophilic aromatic substitution, spectral methods, biological activity

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za veškeré odborné rady a pomoc jak při práci v laboratoři, tak při vyhodnocování výsledků a aktivní přístup k dané problematice.

Také bych chtěl poděkovat Ing. Filipu Zatloukalovi za pomoc a poskytnutí velkého množství praktických rad při práci v laboratoři a měření NMR spekter, dále Ing. Anetě Závodné a Ing. Petru Janovskému za měření GC-MS vzorků a zbytku kolektivu z Ústavu chemie.

Nakonec bych chtěl moc poděkovat své nejbližší rodině a přítelkyni za podporu během celé doby studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 MOŽNOSTI MIKROVLNAMI ASISTOVANÉ SYNTÉZY PURINOVÝCH SLOUČENIN.....	10
1.1 PRINCIP MIKROVLNAMI ASISTOVANÉ SYNTÉZY	10
1.1.1 Konvenční ohřev versus mikrovlnami asistovaná syntéza.....	14
1.2 MIKROVLNAMI ASISTOVANÉ CROSS-COUPLOVÉ REAKCE	16
1.2.1 Cross-couplingové reakce katalyzované kovy	16
1.2.2 Cross-couplingové reakce za vyloučení kovového katalyzátoru	18
1.3 REGIOSELEKTIVNÍ ALKYLACE A ARYLACE	20
2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA 6,9-DISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ	22
2.1 SYNTÉZA MOŽNÝCH PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV	22
2.2 MOŽNÁ PROTIVIROVÁ AKTIVITA NOVĚ VZNIKLÝCH SLOUČENIN.....	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	35
3.2 SYNTÉZA NOVÝCH 6,9-DISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ	36
3.2.1 Alkylace 6-chlor-9 <i>H</i> -purinu.....	36
3.2.2 Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce atomu chloru na C6	37
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1 KOMENTÁŘ K DISKUZNÍ ČÁSTI.....	44
4.2 ALKYLACE 6-CHLOR-9 <i>H</i> -PURINU	45
4.3 MIKROVLNAMI ASISTOVANÁ NUKLEOFILNÍ AROMATICKÉ SUBSTITUCE	47
ZÁVĚR	56
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62
SEZNAM OBRÁZKŮ	64
SEZNAM TABULEK.....	66
SEZNAM PŘÍLOH.....	67

ÚVOD

Purin patří mezi dusíkaté látky, které jsou biologicky důležité pro život. Purinové nukleové báze adenin a guanin tvoří stavební kameny nukleových kyselin. Molekula je tvořena dvěma heterocykly, pyrimidinem a imidazolem, které umožňují velké množství substitucí purinového kruhu nejčastěji do poloh 2, 6, 8 a 9. Z pohledu lékařské chemie jsou puriny hojně studovány díky jejich biologické aktivitě jako možné léčiva. Substituované puriny jsou v dnešní době používány jako protinádorová léčiva, dále je známá jejich protivirová aktivita zejména proti RNA virům, jsou často studovány jako možné selektivní inhibitory proteinkináz.

Na Ústavu chemie se již několik let připravují nové deriváty di- nebo trisubstituovaných purinů, popřípadě jeho biosisosterů, a to s cílem prozkoumat jejich možnou biologickou aktivitu. Tato diplomová práce doplňuje sérii diplomových a bakalářských prací zabývajících se problematikou přípravy derivátů purinu a jeho biosisosterů.

První kapitola teoretické části této diplomové práce se zabývá možnostmi mikrovlnami asistované syntézy purinových sloučenin. Je zde popsán princip mikrovlnami asistované syntézy, dále pak srovnání konvenčního a mikrovlnného zahřevu a nakonec cross-couplingové reakce a regioselektivní alkylace a arylace. Druhá kapitola poskytuje přehled o biologické aktivitě 6,9-disubstituovaných purinů toho času popsaných v literatuře.

Experimentální část popisuje jednotlivé syntetické postupy vedoucí k získání příslušných sloučenin. Jsou zde vypsány spektrální charakteristiky všech látek, které byly v rámci této diplomové práce připraveny.

Poslední a nejdůležitější částí této práce je diskuze, kde jsou komentovány jednotlivé postupy syntézy, které vedly k získání příslušných sloučenin. Jsou zde také popsány výsledky získané pomocí dostupných metod strukturní analýzy.

V diplomové práci je, pro snadnější orientaci případného čtenáře, použit dvojitý způsob číslování sloučenin v práci se vyskytujících, kdy se číslování liší pro teoretickou a praktickou část. V obou případech jsou látky číslovány pomocí arabských číslic. Aby bylo možné sloučeniny vzájemně odlišit, jsou sloučeniny vyskytující se v teoretické části diplomové práce označeny písmenem „L“ (např. L 1).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MOŽNOSTI MIKROVLNAMI ASISTOVANÉ SYNTÉZY PURINOVÝCH SLOUČENIN

1.1 Princip mikrovlnami asistované syntézy

Mikrovlny jsou výkonným a spolehlivým zdrojem energie, který lze přizpůsobit mnoha aplikacím. Porozumění teorii mikrovlnné energie může organickému chemikovi poskytnout správné nástroje a znalosti, jež následně účinně aplikuje při syntéze jím uvažovaných sloučenin.

Mikrovlnami asistovaná syntéza představuje hlavní průlom v metodice syntetické chemie, dramatickou změnu způsobu provádění chemické syntézy a způsobu jejího vnímání ve vědecké komunitě. Konvenční syntéza byla omezena svou časovou náročností a menší efektivitou. Mikrovlnná syntéza dává organickým chemikům více času na rozšíření jejich vědecké tvořivosti, testování nových teorií a vývoj nových procesů. Namísto toho, aby syntetizovali jednu sloučeninu hodiny nebo dokonce dny, mohou nyní provést požadovanou reakci během několika minut. Ve shodě s rychle se rozvíjející základnou aplikací lze mikrovlnnou syntézu efektivně použít na zkrácení reakční doby a získání produktů ve větší čistotě a výtěžku.^{1,2}

Mikrovlnná syntéza navíc vytváří zcela nové možnosti provádění chemických transformací.

Protože mikrovlny mohou přenášet energii přímo na reaktanty (takzvané „molekulární zahřívání“), mohou podporovat transformace, které v současné době není možné provést pomocí konvenčního zahřívání. Toto vytváří novou oblast v syntetické organické chemii.

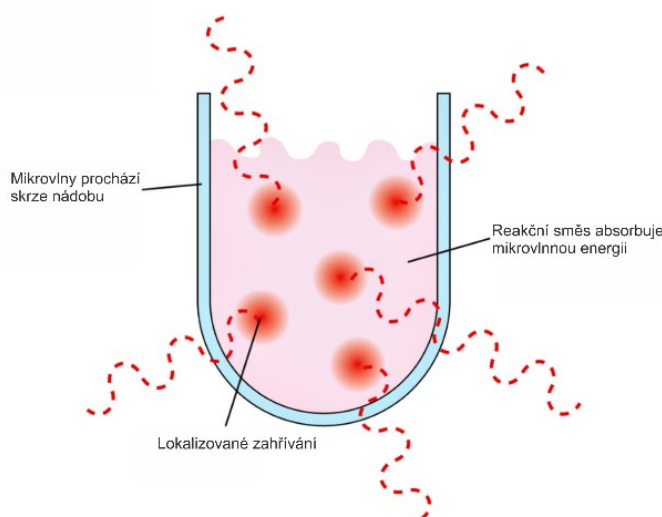
Mikrovlnná syntéza také umožňuje provádět tzv. „chladné reakce“, kdy se energie aplikuje přímo na reaktanty. Při těchto reakcích se používá chlazení, aby nedocházelo k přehřátí použitých sloučenin. To umožňuje provádět reakce s většími a na teplo citlivějšími molekulami (např. proteiny), protože teploty jsou dostatečně nízké, aby se eliminovala tepelná degradace. Tento způsob provádění organických syntéz poskytuje nové příležitosti a představuje nový nástroj pro výzkum proteomiky a geonomie.³

Mikrovlnná energie sestává z elektrického a magnetického pole, ale pouze elektrické pole přenáší energii k zahřátí látky. Energie obsažená v mikrovlnných fotonech je velmi nízká ve srovnání s typickou energií potřebnou ke štěpení molekulárních vazeb. Mikrovlny tedy neovlivní strukturu organické sloučeniny. Při excitaci molekul je účinek mikrovlnné

absorpce čistě kinetický. Frekvence, při které reakce nejčastěji probíhají je 2450 MHz, a tato frekvence odpovídá vlnové délce 12,2 cm. Pro anorganické reakce se tedy používá pouze specifická vlnová délka v mikrovlnném pásmu v rozmezí od 1 centimetru do 1 metru.⁴

Při aplikaci konvenčního způsobu se reakční směs zahřívá pomocí externího zdroje tepla. Může se jednat o přímý (např. topným hnízdem) či nepřímý ohřev (vodní, olejová, kovová či písková lázeň umístěná na elektromagnetické míchačce). Teplo nejprve prochází stěnami reakční nádoby, poté dochází k zahřátí rozpouštědla a reaktantů. Jedná se o pomalý a málo efektivní způsob přenosu energie do systému, protože závisí na tepelné vodivosti různých materiálů, které musí být proniknuty. V důsledku toho je teplota reakční nádoby vyšší než teplota reakční směsi. Až po uplynutí určité doby dojde k vyrovnání teplot mezi reakční nádobou a reakční směsí. Tento proces může trvat i několik hodin.

Na druhou stranu mikrovlnný ohřev představuje naprosto odlišný proces. Jak lze vidět na Obrázku 1, mikrovlny se spojují přímo s molekulami, které jsou přítomny v reakční směsi, což vede k rychlému nárůstu teploty. Protože proces nezávisí na tepelné vodivosti materiálů reakční nádoby, dochází k okamžitému zahřátí reakční směsi. Přenos energie pomocí mikrovln na látku způsobují dva mechanismy, a to rotace dipólu nebo iontové vedení. Mikrovlnné syntézy také nabízí snadnou kontrolu reakce, kdy lze energii dodávanou do systému okamžitě zvýšit či snížit.^{5,6}



Obrázek 1: Proces působení mikrovlnného záření v reakční nádobě.⁷

Rotace dipólu je interakce, ve které se polární molekuly snaží vyrovnat s rychle se měnícím elektrickým polem mikrovlnného reaktoru. Rotační pohyb molekuly při pokusu o orientaci v elektromagnetickém poli vede k přenosu energie. Tento mechanismus souvisí s polaritou molekul a jejich schopností vyrovnat se s elektrickým polem. Existuje celá řada faktorů, které v konečném důsledku určují účinnost vazby dipólové rotace, nicméně všechny přítomné polární sloučeniny (rozpouštědlo, substrát) se setkají s tímto mechanismem přenosu energie.^{8,9}

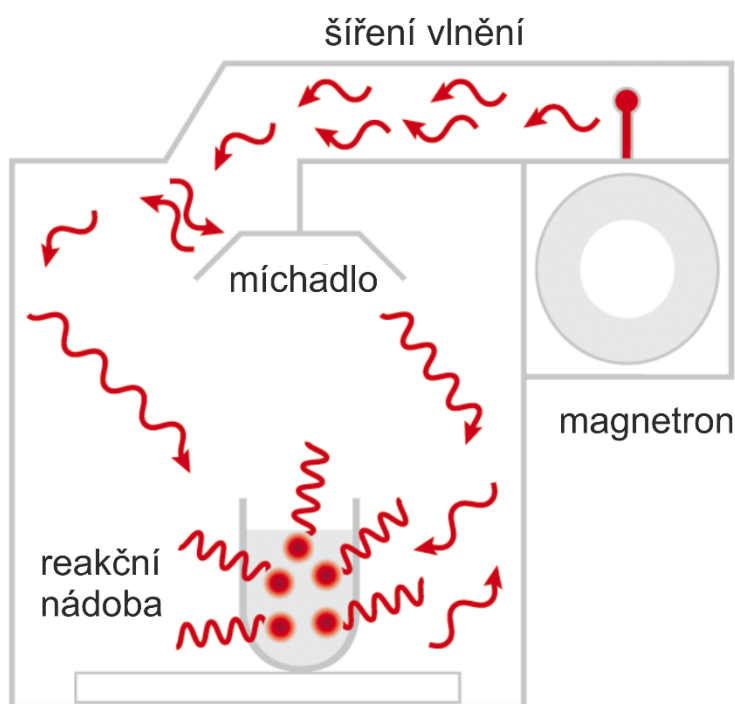
Druhým způsobem přenosu energie je iontová vodivost, ke které dochází, pokud jsou v zahřáté látce přítomny volné ionty nebo iontové látky. Elektrické pole generuje iontový pohyb, když se molekuly snaží orientovat na rychle se měnící pole. To způsobí dříve popsané okamžité přehřátí. Teplota látky také ovlivňuje iontové vedení, čím víc se teplota zvyšuje, tím je přenos energie efektivnější.^{10,11}

V moderních mikrovlnných reaktorech se používají systémy monomódové nebo multimódové. V těchto reaktorech se reakční zkumavka nachází v pevné poloze a po zapnutí vzniká kontinuální stacionární vlnění, které má přesně definované oblasti intenzity pole v maximum a minimum. Monomódové reaktory mají malé kompaktní dutiny, ve kterých je mikrovlnné záření přímo zaostřeno na jednu jedinou nádobu obsahující reakční směs (Obrázek 2). V důsledku toho je zajištěna vysoká hustota mikrovlnného pole, což má za následek mimořádně vysoké rychlosti zahřívání. Monomódový reaktor kombinovaný s odpovídajícím systémem regulace teploty tedy umožňuje optimální reprodukovatelnost a energetickou účinnost. Nevýhodou monomódových kavit je však to, že umožňují pracovat s relativně malými objemy reakčních směsí. Maximální použitelný objem činí 20 ml, což z nich činí ideální nástroj pro optimalizaci chemických reakcí v malém měřítku.¹²



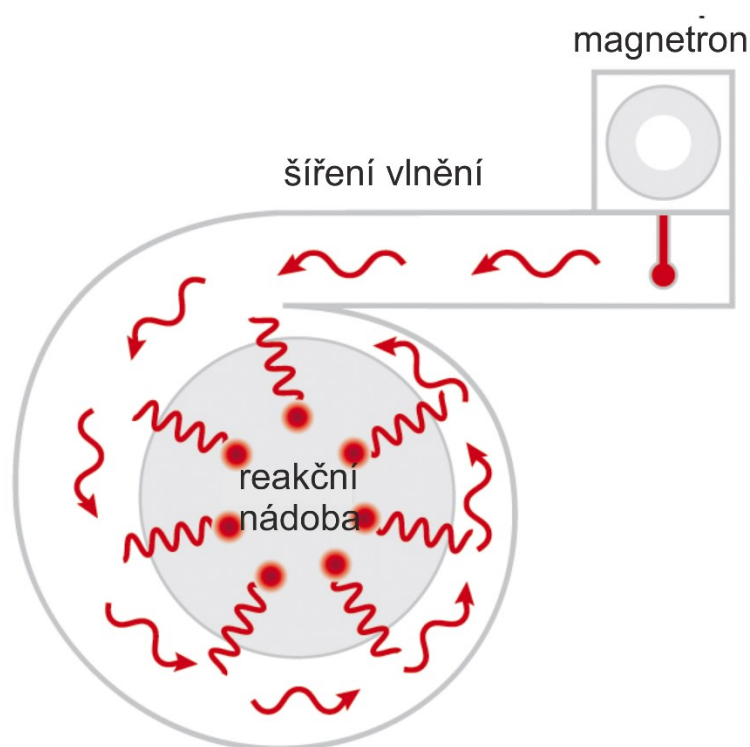
Obrázek 2: Schéma distribuce mikrovln v monomódovém reaktoru.¹³

Multimódové reaktory mají větší dutiny, ve kterých je mikrovlnné pole chaoticky rozloženo. V běžných, tzv. paralelních multimódových reaktorech (Obrázek 3) se vlny odrážejí od stěn dutiny a několik elektromagnetických vln interaguje se zařízením dutiny. Vzhledem k jejich větší velikosti mohou tyto přístroje hostit různé typy rotorů. Mohou být použity pro syntézu v mikro i makro měřítku, tedy od objemu 300 μl až po provádění syntéz ve 100 ml reakčních nádobách.



Obrázek 3: Schéma distribuce mikrovln v multimódovém paralelním reaktoru.¹³

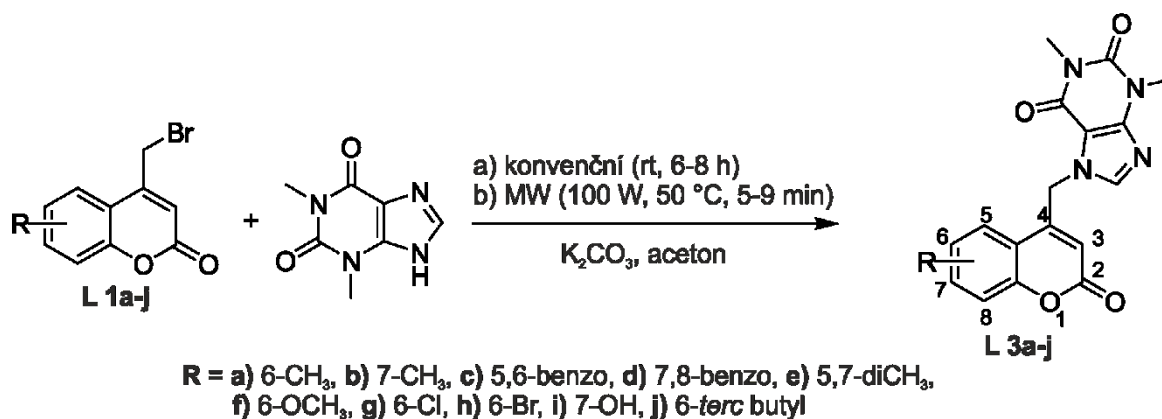
Další typem multimódového reaktoru je ten pro jednodávkové zvětšování množství (Obrázek 4). Tento speciální druh multimódového reaktoru je vybaven kruhovým vlnovodem, ve kterém různé elektromagnetické vlny interagují s obsahem reakční nádoby na různých místech pro účinné zahřívání větších objemů. V kompaktní dutině, která poskytuje relativně vysokou hustotu pole, je umístěna nádoba o objemu 1 litru. To má za následek optimalizované rychlosti ohřevu pro reakce prováděné ve větších objemech. Nejčastěji se k reakcím používají nádoby z materiálu, který je prakticky průhledný pro mikrovlny při provozní frekvenci, jako je například borosilikátové sklo, nebo polytetrafluorethylen (teflon), který má vysokou chemickou odolnost.^{14,15}



Obrázek 4: Schéma distribuce mikrovln v multimódovém jednodávkovém reaktoru.¹³

1.1.1 Konvenční ohřev versus mikrovlnami asistovaná syntéza

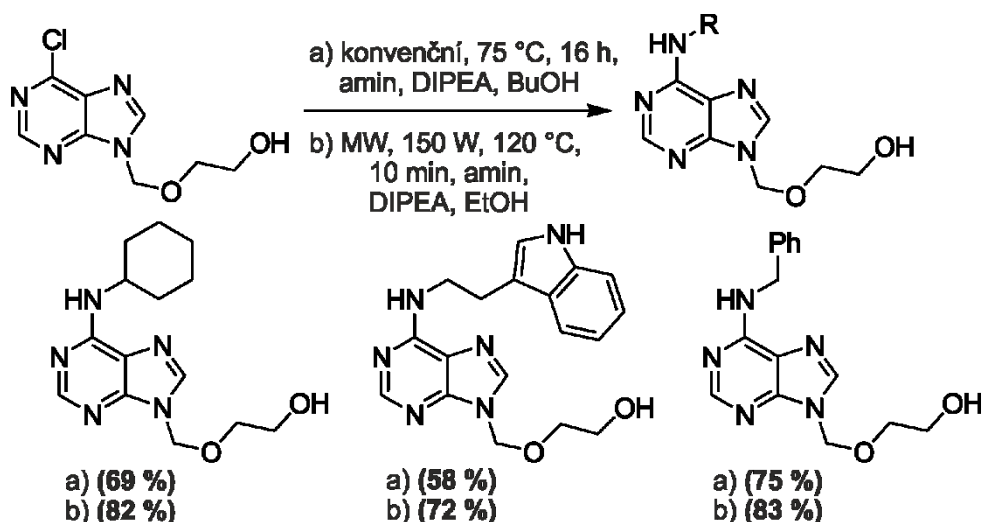
Mangasuli a spolupracovníci ve své práci¹⁶ zkoumali antioxidační účinky derivátů kumarinu a purinu. Při syntéze derivátů srovnávali účinky mikrovlnného záření a konvenčního ohřevu. Ve své předchozí práci¹⁷ při syntéze derivátů kumarinu a purinu, jakožto látek s možnými antimikrobiálními a tuberkulostatickými vlastnostmi, prováděli reakce konvenčním způsobem. Tyto reakce probíhaly při laboratorní teplotě 6 až 8 hodin. Při použití mikrovlnného reaktoru, došlo ke snížení reakční doby na pouhých 5 až 9 minut při 50 °C. Na základě výsledků získaných z provedených experimentů je patrné, že mikrovlnný ohřev byl, ve srovnání s konvenčním, podstatně efektivnější a poskytoval připravované sloučeniny ve vynikajících výtěžcích (Obrázek 5).



Sloučenina	R	Výtěžky		Reakční čas	
		Konvenční	MW	Konvenční (h)	MW (min)
L 3a	6-CH ₃	85	97	360	5
L 3b	7-CH ₃	84	96	360	6
L 3c	5,6-benzo	80	94	420	5
L 3d	7,8-benzo	83	92	450	6
L 3e	5,7-dimethyl	84	96	420	8
L 3f	6-OCH ₃	80	90	450	8
L 3g	6-Cl	75	90	480	9
L 3h	6-Br	73	91	480	6
L 3i	7-OH	74	90	450	5
L 3j	6- <i>terc</i> butyl	84	94	390	9

Obrázek 5: Schéma srovnání konvenční a mikrovlnné přípravy derivátů.

Schmalz a kolektiv¹⁸ popsali syntézu acyklovirových bioisosterů prostřednictvím C6 nukleofilních aromatických substitucí jako klíčového kroku. Reakce byly prováděny buď konvenčním způsobem nebo pomocí mikrovlnami asistované syntézy v monomódovém reaktoru při 120 °C po dobu 10 minut (Obrázek 6), čímž byly získány všestranné acyklovirové analogy. Mikrovlnami asistované reakce probíhaly ve všech případech s vyššími výtěžky (72–83 %). Naproti tomu při konvenčním zahřívání k dosažení uspokojivých výsledků bylo zapotřebí delší reakční doby (16 hodin), ale ani to nestačilo k izolaci připravovaných sloučenin v uspokojivých výtěžcích (58–75 %). Mikrovlnné zahřívání tedy umožňuje zvýšení reakční rychlosti a výtěžků na rozdíl od konvenčního způsobu zahřívání.



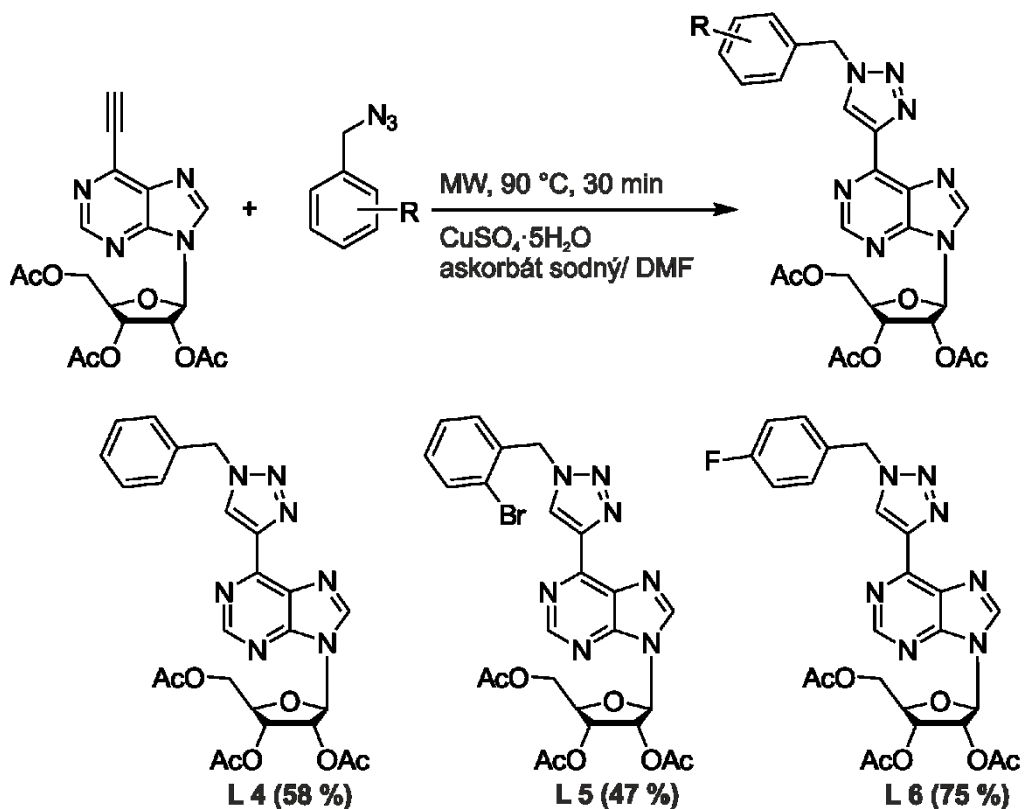
Obrázek 6: Syntéza acyklovirových bioisosterů.

1.2 Mikrovlnami asistované cross-couplingové reakce

1.2.1 Cross-couplingové reakce katalyzované kovy

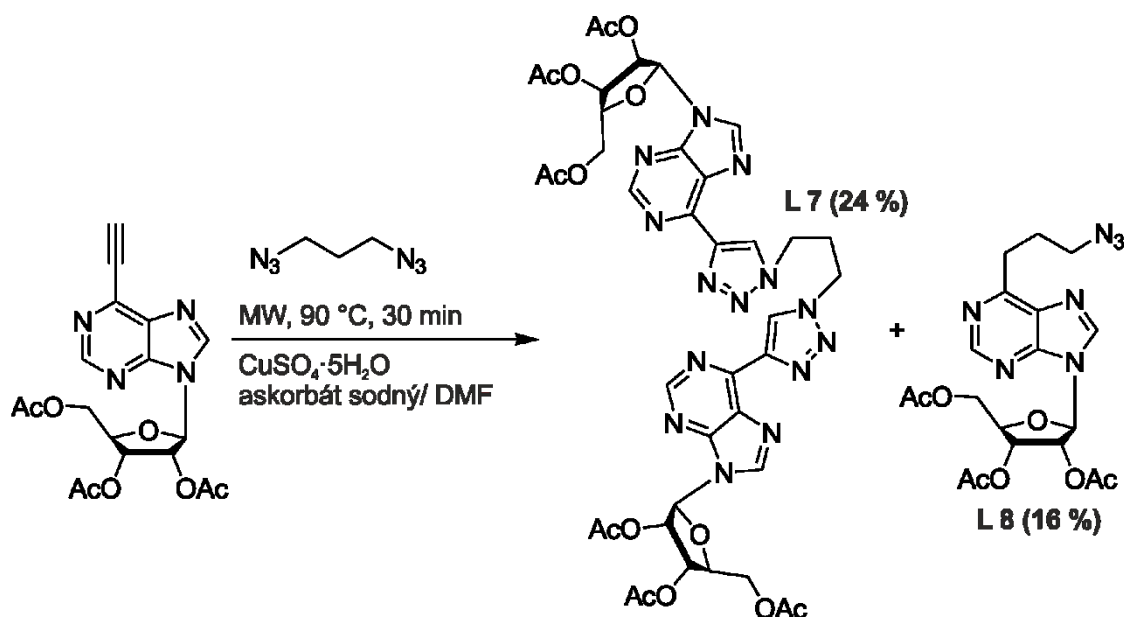
Na základě průkopnické práce Ullmanna a Goldberga prošly v průběhu let cross-couplingové reakce katalyzované kovy velkým vývojem a nyní představují pohodlnou a praktickou metodu pro konstrukci nových léčiv, agrochemikálií, polymerů, syntézu sloučenin izolovaných z přírodních produktů a dalších látek. Typicky se tyto reakce provádějí konvenčním způsobem, např. zahříváním na olejové lázni, nicméně spojení kovových katalyzátorů a mikrovlnného ohřevu poskytlo organickým chemikům naprosto nový a velmi účinný nástroj při tvorbě vazeb C–C nebo C–heteroatom.^{19,20}

Rodriguez a spolupracovníci ve své práci²¹ popisují mikrovlnami asistovanou 1,3-dipolární cykloadici C6 alkylovaného adenosinu a benzylamidů za použití mědi (v podobě pentahydrátu síranu měďnatého) jako kovového katalyzátoru. Nové deriváty vázané na triazol byly testovány na agonisty a antagonisty receptoru adenosinu A1. Výchozí látky byly zahřívány v přítomnosti $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a askorbátu sodného za užití mikrovlnného ohřevu při 90 °C po dobu 30 minut (Obrázek 7), čímž vznikly purinové deriváty obsahující na C6 triazolový kruh. Výtěžky provedených reakcí se pohybovaly v rozmezí 47–75 %.



Obrázek 7: Příklad mikrovlnami asistované 1,3-dipolární cykloadice.

Kromě toho autoři také provedli dvojnásobnou cykloadici za použití 1,3-diazidopropanu a adenosin-6-ynu (Obrázek 8), která vedla k syntéze produktu L 7 ve výtěžku 24 % a neočekávaného produktu L 8 ve výtěžku 16 %.

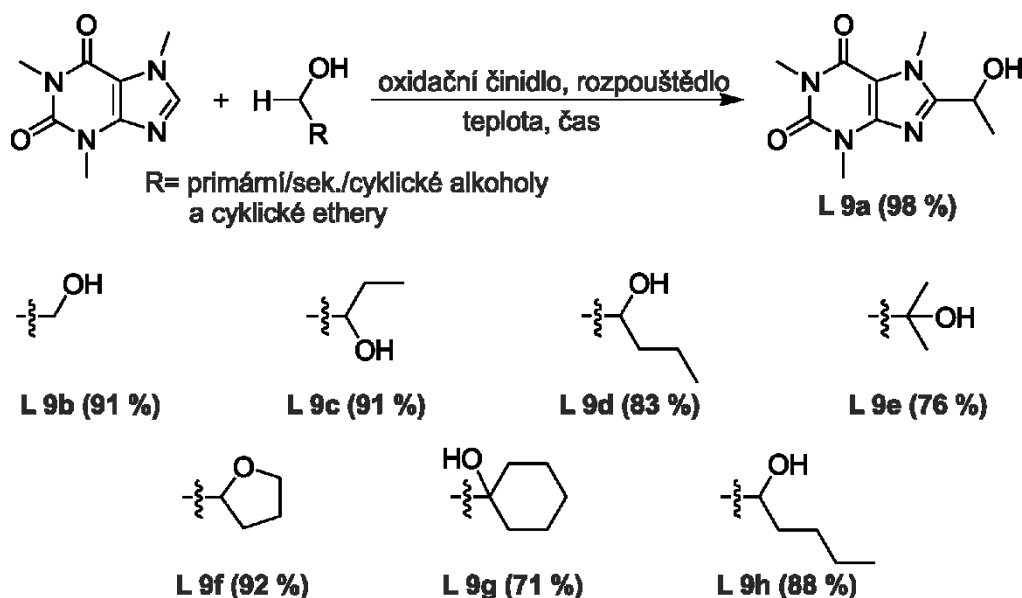


Obrázek 8: Schéma dvojnásobné cykloadice za užití 1,3-diazidopropanu.

1.2.2 Cross-couplingové reakce za vyloučení kovového katalyzátoru

Popis účinné cross-couplingové dehydrogenativní syntézy kofeinu v poloze C8 se substituovanými alifatickými, alicyklickými alkoholy nebo cyklickými ethery byla vypracován Shyamlalem a jeho skupinou.²² Reakce probíhaly v mikrovlnném reaktoru bez přítomnosti kovového katalyzátoru, který byl nahrazen různými oxidačními činidly (H_2O_2 , dikumylperoxid, oxon, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, TEMPO ((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl), DTBP (di-*tert*-butyl peroxid), TBHP (*tert*-butyl hydroperoxid)), blíže viz experiment 1–7 v tabulce Obrázku 9. Z optimalizačních reakcí příslušných oxidantů vyšel nejlépe *tert*-butyl hydroperoxid, u kterého byly dále provedeny syntézy se změnou molárních přebytků (Obrázek 9, experiment 8–10). Autoři dále studovali vliv změny teploty a času s použitím TBHP v šesti molárním nadbytku, který měl nejlepší výtěžky reakcí při 120 °C a 20 minutách. Jak autoři očekávali, snižování teploty nebo času nemělo přírůstkový účinek na výtěžek. Ani prodloužení reakčního času na 30 minut nevykazovalo podstatný vliv na výtěžek, což lze vidět na Obrázku 9 (experiment 12–15). Reakce s šesti molárním přebytkem TBHP (Obrázek 9, experiment 11) byla vybrána jako výchozí pro syntézu nových derivátů kofeinu s alifatickými, alicyklickými alkoholy a cyklickými ethery. Sloučeniny L 9b a L 9c vykazovaly slibnou antioxidační aktivitu (11,0 a 10,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve srovnání se standardní referenční hodnotou inhibiční koncentrace kyseliny askorbové ($\text{IC}_{50} = 4,56 \mu\text{g}/\text{ml}$). Ostatní připravené sloučeniny vykazovaly mírnou nebo slabou

antioxidační aktivitu. Sloučenina L 9h vykazovala 2krát vyšší protidestičkovou aktivitu než referenční aspirin (21,39 $\mu\text{g/ml}$) a sloučenina L 9a měla s aspirinem srovnatelnou aktivitu. Protidestičková léčba se užívá při prevenci trombotických cerebrovaskulárních nebo kardiovaskulárních onemocnění. Při této léčbě dochází k snížení schopnosti tvorby krevních sraženin.

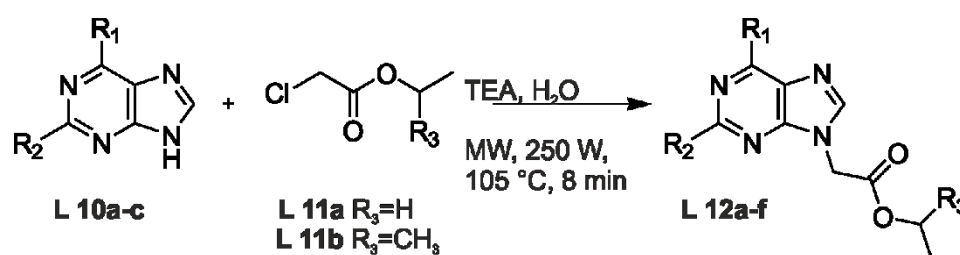


Experiment	Oxidační čidlo (eq.)	Teplota (°C)	Čas (min)	Izolovaný výtěžek (%)
1	H ₂ O ₂ (2)	110	20	25
2	DCP (2)	110	20	15
3	Oxon (2)	110	20	0
4	K ₂ S ₂ O ₈ (2)	110	20	0
5	TEMPO (2)	110	20	0
6	DTBP (2)	110	20	10
7	TBHP (2)	110	20	69
8	TBHP (4)	110	20	80
9	TBHP (6)	110	20	92
10	TBHP (8)	110	20	89
11	TBHP (6)	120	20	98
12	TBHP (6)	100	20	74
13	TBHP (6)	120	10	50
14	TBHP (6)	120	30	95
15	TBHP (6)	150	1440	96

Obrázek 9: Schéma syntézy kofeinových derivátů.

1.3 Regioselektivní alkylace a arylace

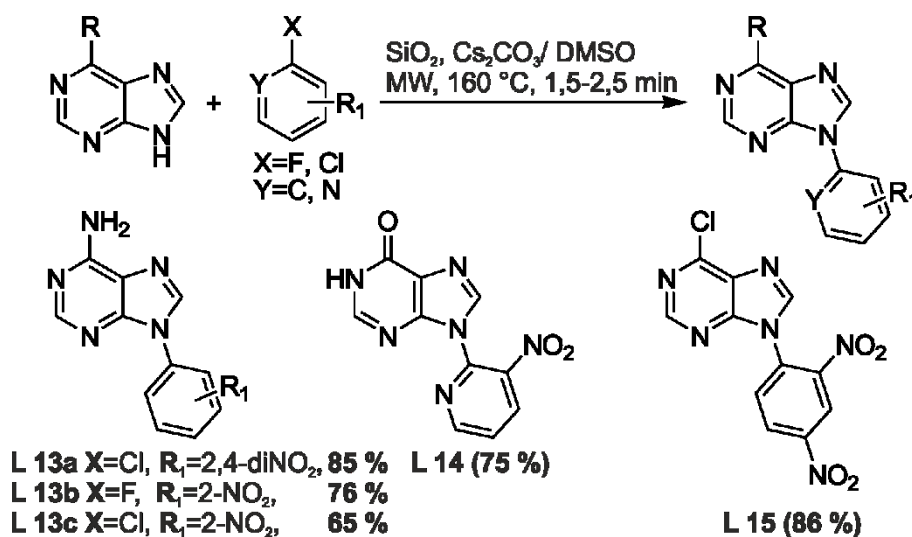
Peptidové nukleové kyseliny (PNA) přitahují v lékařské chemii širokou pozornost pro vývoj biosenzorů a genových terapeutických léčiv. Hlavní řetězec DNA tvořený sacharidy a fosfátovými zbytky, byl nahrazen polyamidovou kostrou. Díky tomu PNA vykazují vyšší tepelnou stabilitu a lepší sekvenční rozlišení než DNA. Nevýhodami při jejich syntéze jsou nízké výtěžky, špatná regioselektivita, dlouhá reakční doba a nutnost použití „drastických“ reakčních podmínek. Qu a kolektiv²³ proto vyvinuli rychlý a pohodlný postup pro syntézu stavebních kamenů PNA. Ve své práci použili mikrovlnami asistovanou syntézu, čímž snížili reakční dobu na 8 minut. Jako rozpouštědlo byla použita voda a jako báze triethylamin (Obrázek 10). Použití reaktantu L 11a nebo L 11b vedlo k drobným změnám ve výtěžcích. Lze usoudit, že alkylové postranní řetězce v chloracetátu neovlivňují jejich elektrofilní reaktivitu. Také náhrada atomu vodíku za atom chloru v poloze R₂ nezpůsobila výrazné změny ve výtěžcích reakce. Alkylové N6-benzylaminopurinu (L 10c) byly získány produkty L 12c a L 12f ve výtěžcích 78 a 81 %. Jednotlivé reakce poskytly výhradně N9-alkylované produkty. Absence N7-alkylovaných produktů je způsobena zřejmě vyšší hustotou elektronů v poloze N9. Při stejných reakčních podmínkách byla zkoumána účinnost konvenčního a mikrovlnného zahřívání. Bylo zjištěno, že po 8 minutách konvenčního záhřevu vzniklo pouze 16 % sloučeniny L 12a a po 6 hodinách činil výtěžek 52 %. Mikrovlnná syntéza tedy urychluje a zdatelně zlepšuje chod reakce.



Experiment	Derivát purinu	R ₁	R ₂	R ₃	Produkt	Izolovaný výtěžek (%)
1	L 10a	Cl	H	H	12a	72
2	L 10b	Cl	Cl	H	12b	70
3	L 10c	benzylamin	H	H	12c	78
4	L 10a	Cl	H	CH ₃	12d	69
5	L 10b	Cl	Cl	CH ₃	12e	74
6	L 10c	benzylamin	H	CH ₃	12f	81

Obrázek 10: Schéma mikrovlnami asistované syntézy stavebních kamenů PNA.

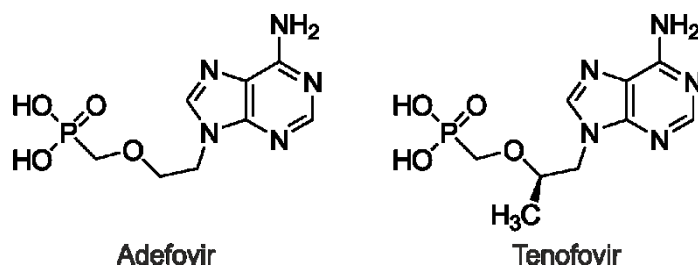
V souvislosti s regioselektivními arylacemi bylo přemístění halogenu ze silně elektronově deficitního (hetero)aromatického uhlovodíku za užití mikrovln popsáno Khalafi-Nezhadem a spolupracovníky.²⁴ Ve své publikaci popisují mikrovlnami asistovanou syntézu purinů a (hetero)arenů v přítomnosti Cs₂CO₃ a silikagelu, jako pevného nosiče, při teplotě 160 °C po dobu 1,5 až 2,5 minuty v DMSO (Obrázek 11). Touto reakcí byly získány arylové puriny ve výtěžcích 65–85 %. Běžné zahřívání na olejové lázni mělo za následek dvojnásobné snížení výtěžků a to i po 180 minutách zahřívání. Reakcí purinu s 2-nitroarylhalogenidy (fluor, chlor) bylo zkoumáno, která ze skupin snadněji odstupuje. Jak bylo očekáváno, reakce purinu s 2-nitroarylfluoridem byla nejučinnější, kvůli vyšší elektronegativitě atomu fluoru, který zvyšuje kladný náboj na reagujícím uhlíku.



Obrázek 11: Příklad mikrovlnami asistované syntézy na pevném nosiči.

2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA 6,9-DISUBSTITUOVANÝCH PURINŮ

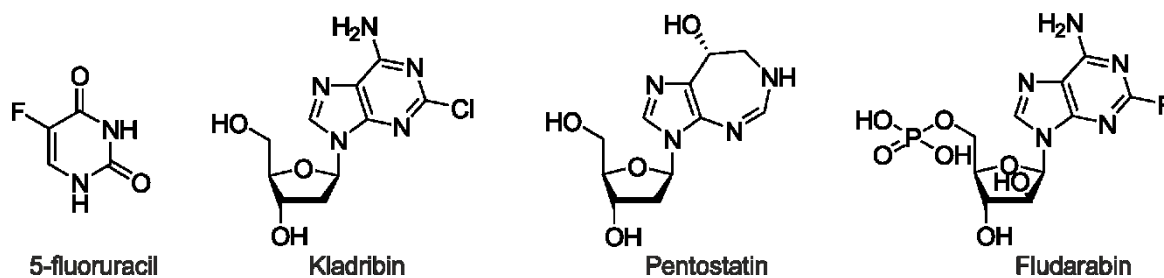
Purin byl objeven v roce 1884 Emilem Fischerem, jako heterocyklický systém imidazo[4,5-*d*]pyrimidin.²⁵ Zjistil, že purin je nejvíce všudypřítomný heterocyklus obsahující dusík v přírodě a je základní strukturou adeninu a guaninu v RNA a DNA.²⁶ Také v lékařské chemii přitahovaly purinové skelety hodně pozornosti v důsledku jejich převahy ve farmaceuticky nezbytných sloučeninách. Puriny a jejich deriváty patří mezi inhibitory různých mediátorů a kináz. Například olomoucín, roscovitin a purvalanol A patří mezi nejúčinnější inhibitory proteinkináz.²⁷ V oblasti infekčních chorob jako je tuberkulóza, bylo zjištěno, že 19 čtených purinových nukleosidů je selektivních proti *Mycobacterium tuberculosis*.²⁸ Purinové transportéry jsou považovány za ideální cíl pro objevování a vývoj nových antimalarik.²⁹ Acyklický fosfonát nukleosidu například Adefovir a Tenofovir, se používají v klinické praxi ke zmírnění projevů způsobovaných při infekci virem lidské imunodeficiency (HIV) a k léčbě hepatitidy B.³⁰



Obrázek 12: Příklady léčiv proti hepatidě typu B.

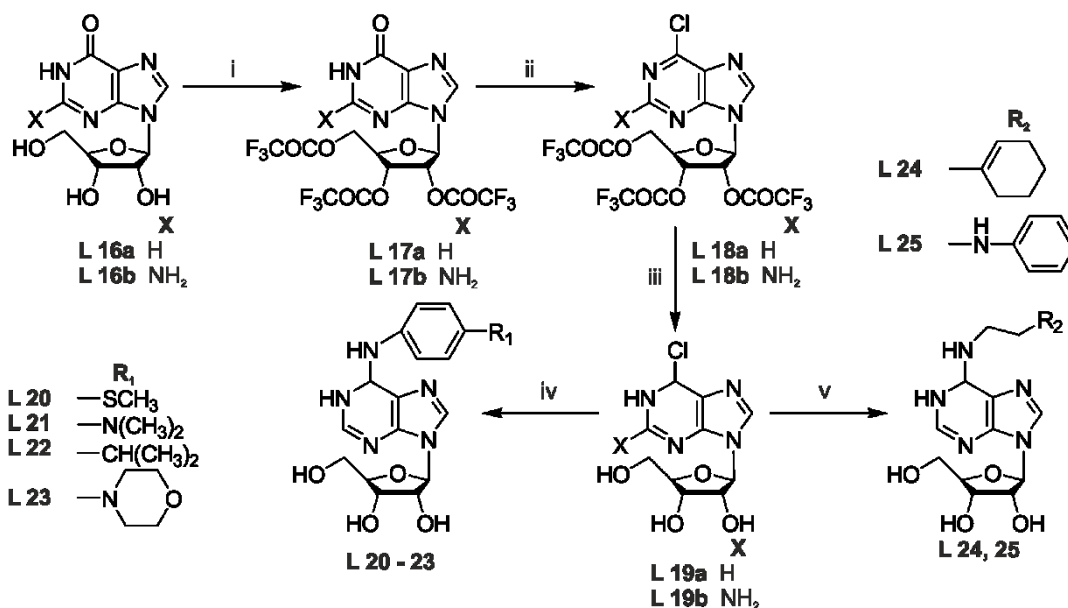
2.1 Syntéza možných protinádorových léčiv

Rakovina je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na světě. V roce 2018 zemřelo téměř 9,5 milionu osob ve světě a přibylo 18 milionů nových případů a.³¹ Vývoj nových účinných a selektivních protinádorových léčiv je proto pro medicínskou chemii velmi důležitý. Nukleové báze a nukleosidy jsou často využívány jako chemoterapeutická činidla při léčbě rakoviny. Nukleotidové sloučeniny s podobnou strukturou se podílejí na mnoha buněčných procesech, jako je růst a dělení buněk, a proto se často využívají jako antineoplastická činidla, kdy dochází k poškození DNA u nádorových buněk.³² 5-fluoruracil (5-FU, Obrázek 13), který je derivátem nukleové báze s atomem fluoru, je často preferovaným protirakovinným léčivem. Podobně byly popsány i jiné purinové nukleosidy jako Fludarabin, Kladribin a Pentostatin (Obrázek 13).



Obrázek 13: Příklady protinádorových léčiv.

Tyto analogy dosahují nerovnováhy v dNTP (deoxyribonukleotidtrifosfát) inhibicí enzymu ribonukleotid reduktázy, který indukuje degradaci syntézy DNA. Proto nukleosidy s protirakovinovou aktivitou obecně indukují apoptózu buněk.³³ Rakovina jater je pátým nejčastěji se vyskytujícím typem rakoviny u mužů a sedmým u žen, přičemž představuje 7 % všech případů rakoviny. Jelikož vykazuje rakovina jater značnou rezistenci vůči konvenčním chemoterapeutikům, je nezbytné identifikovat nová terapeutická léčiva. Tuncbilek spolu se svými kolegy³⁴ již dříve použili purinové a purin-nukleosidové deriváty, které vykazovaly slibné cytotoxické účinky *in vitro* na buňkách rakoviny jater. V této práci se zabývali syntézou nové řady 6-substituovaných derivátů amino-9-(β-D-ribofuranosyl)purinů, u nichž byly studovány jejich cytotoxické účinky byly na lidských epitelových rakovinných buňkách jater (Huh7), tlustého střeva (HCT116) a prsu (MCF7). Nukleosidy nesoucí v poloze C6 4-substituované aniliny nebo 2-substituované ethylaminy byly získány nukleofilní aromatickou substitucí 6-chlor-9-(β-D-ribofuranosyl)purinu s příslušnými aniliny a ethylaminy za podmínek uvedených na Obrázku 14. Bylo navrženo a připraveno čtrnáct nových nukleosidových derivátů. Výsledky ukázaly, že sloučenina L 24 by mohla být slibným kandidátem na chemoterapeutické léčivo s hodnotami IC₅₀ nižšími než 10 μM v rakovinných buňkách jater, tlustého střeva a prsu (Obrázek 14). S cílem prozkoumat potenciální použití proti hepatocelulárnímu karcinomu (HCC), byla biologická aktivita sloučeniny L 24 testována na panelu buněčných linií rakoviny jater. Inhibiční koncentrace (IC₅₀), sloučeniny L 24 na buňkách rakoviny jater HepG2, měla hodnotu 1 μM.



Syntéza sloučenin: činidla: i) TFAA, CH₂Cl₂; ii) SOCl₂, DMF; iii) MeOH, 19a 50 %, 19b 56 %, iv) 4-substituované aniliny, Et₃N, EtOH, 20 22 %, 21 20 %, 22 54 %, 23 24 %; v) 2-substituované ethylaminy, Et₃N, EtOH, 24 10 %, 25 10 %.

Sloučenina	Nádorová buněčná linie, IC ₅₀ (μM)		
	Huh7	HCT116	MCF7
L 20	NI	>100	NI
L 21	80±80	40±10	30±8
L 22	60±40	10±2	50±20
L 23	NI	NI	80±60
L 24	>100	6±1	3±1
L 25	NI	30±10	>100
5-FU	30±2	4±0,3	3±0,7
Fludarabin	30±20	8±3	15±0,1
Kladribin	0,9±0,7	<0,1	2±2

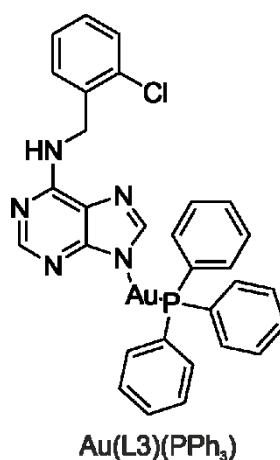
Sloučenina	HCC buněčná linie, IC ₅₀ (μM)			
	Huh7	HepG2	MAHLAVU	FOCUS
L 24	>100	1±0,2	>100	NI
5-FU	30±2	5±0,8	10±2	4±0,5
Fludarabin	30±20	20±6	10±5	10±1
Kladribin	0,4±0,01	0,04±0,003	0,1±0,01	0,4±0,01

*NI – žádná inhibice

Obrázek 14: Syntéza a biologická aktivita nové řady 6-substituovaných derivátů amino-9-(β-D-ribofuranosyl)purinu.

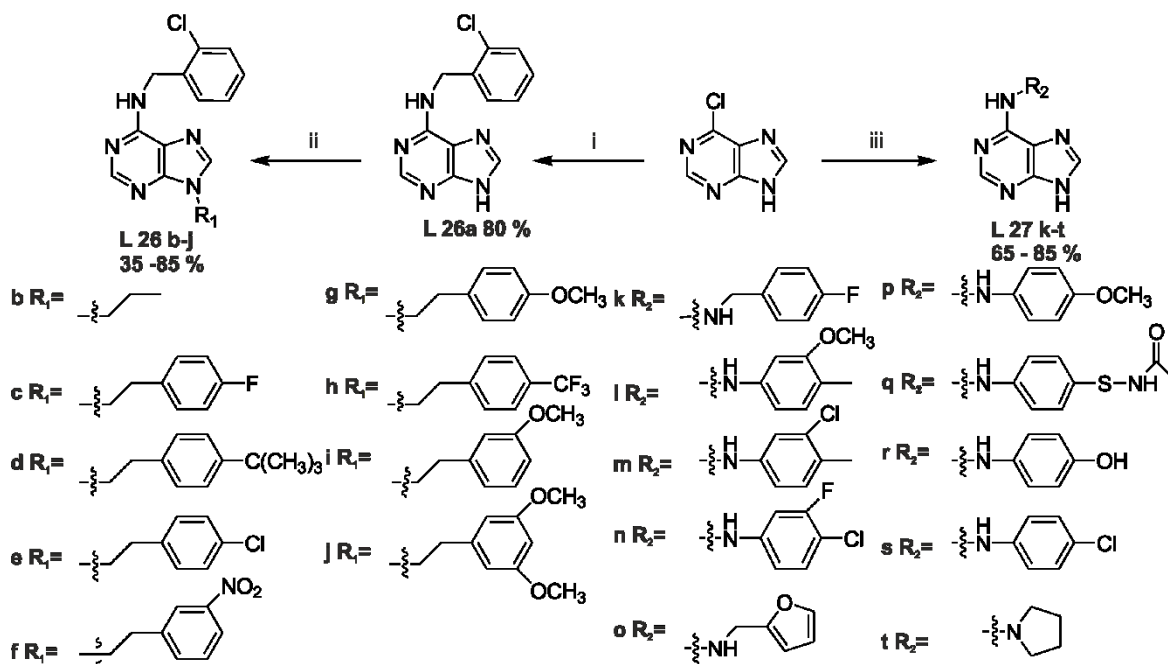
Zánětlivá reakce hraje významnou roli ve vývoji různých lidských chronických onemocnění jako je bronchitida, rakovina, diabetes a revmatoidní artritida.³⁵ Aktivované makrofágy mají zásadní roli při vylučování bioaktivních zánětlivých mediátorů při iniciaci a rozvoji zánětu. Makrofágy jsou buňky imunitní soustavy a fagocytují odumřelé, cizí, nefunkční a nemocné buňky.³⁶ Mezi tyto zánětlivé mediátory patří například prostaglandiny, oxid dusnatý a různé cytokiny (faktor nádorové nekrózy α, interleukin-6 a interleukin 1β), které mohou aktivovat nukleární faktor κβ (faktor ovlivňující expresi

genu) a mitogenem aktivovanou proteinovou kinázu. Inhibice signální dráhy mitogenem aktivované proteinové kinázy a nukleárního faktoru $\kappa\beta$ tedy mohou účinně zmírnit výskyt a vývoj zánětu.³⁷ Z dřívějších studií autoři zjistili, že purinové deriváty, které vykazují protizánětlivou reakci, jsou založeny hlavně na derivátech purinů substituovaných v polohách 9-, 2,6,9-, 2,8,9- a 2,6,8,9- purinového skeletu. Jejich inspirací byla práce skupiny Gabriely Pražanové,³⁸ v níž se uvádí, že sloučenina $\text{Au(L3)}(\text{PPh}_3)$, jejíž struktura je znázorněna na Obrázku 15, má silnou protizánětlivou aktivitu a může významně snížit produkci prozánětlivých cytokinů v makrofázích. Předmětná sloučenina však vykazovala silný cytotoxický účinek s hodnotou smrtelné dávky ($\text{LD}_{50} = 1,87 \mu\text{M}$).



Obrázek 15: Vzorec sloučeniny $\text{Au(L3)}(\text{PPh}_3)$.

Proto Wang a kolektiv³⁹ zkoumali protizánětlivou aktivitu 6-substituovaných a 6,9-disubstituovaných purinů bez zlatého komplexu. Ve své práci provedli syntézu 20 sloučenin na základní kostře 6-chlorpurinu. Cytotoxický účinek vzniklých látek byl hodnocen na lidských buněčných liniích akutní monocytární leukémie (THP-1). Výsledky ukázaly, že nové deriváty snižovaly životaschopnost nádorových buněk o 0–10 %, na rozdíl od derivátu se zlatným komplexem, který životaschopnost snižoval až o 60 % (Obrázek 16). Rovněž některé nové deriváty by mohly výrazně snížit produkci prozánětlivých cytokinů a proto budou dále studovány pro aplikaci jako potenciální léky.



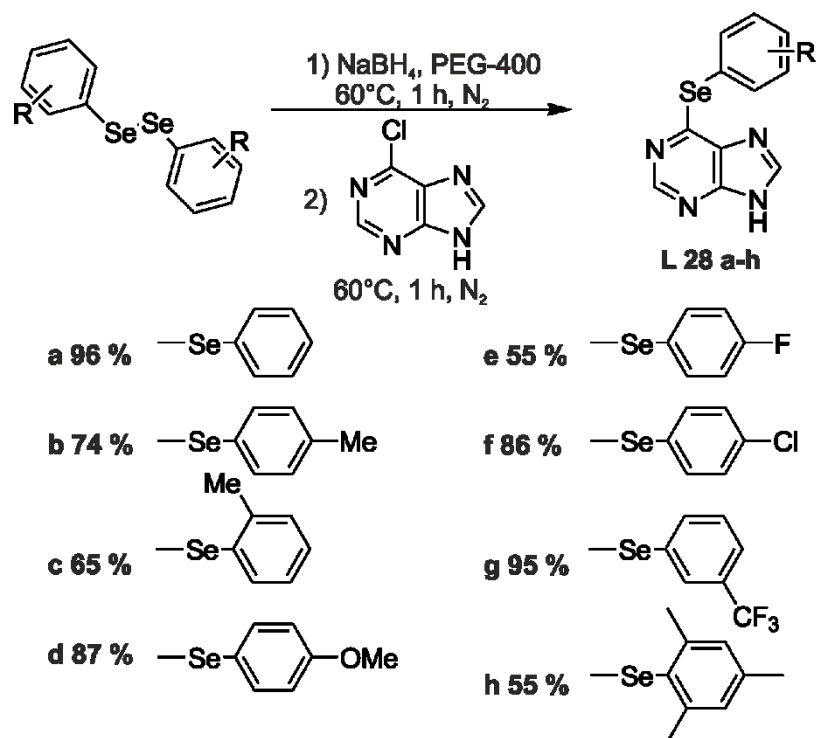
Syntéza L 26 a-j a L 27 k-t: i) (2-chlorofenyl)methanamin, butanol, TEA, 110°C, 5 h; ii) halogenovaný uhlovodík, acetonitril, K₂CO₃, 80°C, 24 h; iii) aromatický amin/ pyrrolidin, butanol, TEA, 110°C, 5h.

Sloučenina	Životaschopnost THP-1 buněk (%)	Sloučenina	Životaschopnost THP-1 buněk (%)
L 26a	93,77±6,6	L 27k	92,88±6,5
L 26b	103,41±6,9	L 27l	90,71±8,6
L 26c	95,46±9,3	L 27m	71,02±9,8
L 26d	107,07±7,4	L 27n	99,31±4,6
L 26e	103,47±6,3	L 27o	106,87±3,2
L 26f	105,18±5,5	L 27p	99,97±6,5
L 26g	98,72±7,6	L 27q	90,65±7,3
L 26h	90,19±7,4	L 27r	95,90±8,7
L 26i	104,13±6,5	L 27s	92,03±7,2
L 26j	99,93±4,6	L 27t	91,10±8,2
Au(L3)PPh ₃	43,14±3,7		

Obrázek 16: Syntéza a biologická aktivita 6-substituovaných a 6,9-disubstituovaných purinů.

Nukleosidové analogy hrají významné role v mnoha biologických procesech. Existuje pět dusíkatých bází, které tvoří nukleosidy a dvě z nich jsou bázemi purinovými (adenin a guanin). Díky své rozmanitosti vykazují velké množství rozmanitých biologických účinků, např. protinádorové, antituberkulové, fungicidní a antioxidační.^{40,41} Selen je stopový prvek, který je považován za nezbytnou výživovou látku pro všechny savce. Tento prvek hraje v těle důležitou úlohu jako antioxidant a plní několik fyziologických funkcí

v metabolických drahách, včetně hormonálního metabolismu a imunitního systému. Organoselenové sloučeniny jsou považovány za atraktivní syntetické látky a je jim přisuzováno mnoho důležitých farmakologických vlastností.⁴² V tomto smyslu jsou puriny obsahující selen zajímavou skupinou sloučenin, protože kombinují dobře známou použitelnost purinové kostry se selenovými zbytky. S ohledem na výše uvedená fakta si ve své práci Duarte a spol.⁴³ vybrali syntézu 6-arylselanylpurinů za použití tetrahydridoboritanu sodného a polyethylenglykolu 400 (PEG 400) jako rozpouštědla (Obrázek 17). Syntetizované sloučeniny byly testovány *in vitro* na jejich antioxidační účinek a inhibiční účinek na aktivitu cerebrální acetylcholinesterázy (AChE). Jedná se o enzym, který rozkládá neurotransmitter acetylcholin za vzniku cholinu a acetátu. Nachází se hlavně v nervosvalových spojeních. Porucha acetylcholinových drah může vést až k rozpadu osobnosti (např. Alzheimerova choroba). Inhibitory AChE přechodně zpomalují průběh onemocnění. Nejprve byl do směsi difenylselenidu, rozpuštěného v polyethylenglykolu 400, přidán Na[BH₄] pod ochrannou atmosférou dusíku a reakce byla zahřívána jednu hodinu při 60 °C. Po uplynutí této doby byl přidán 6-chlor-9H-purin a směs byla míchána při stejné teplotě další hodinu. Výtěžky, v nichž byly požadované sloučeniny izolovány, se pohybovaly mezi 55–96 %. Biologické studie odhalily slibné antioxidační účinky všech syntetizovaných derivátů. Mimo to byl prokázán inhibiční účinek *in vitro* na cerebrální AChE aktivitu v mozkové kůře myši. Purinový derivát obsahující fluor v chemické struktuře (L 28e) inhiboval aktivitu AChE z 68 % a mohlo by se jednat o slibné terapeutické činidlo pro léčbu Alzheimerovy choroby.



Obrázek 17: Syntéza 6-arylselanylpurinů.

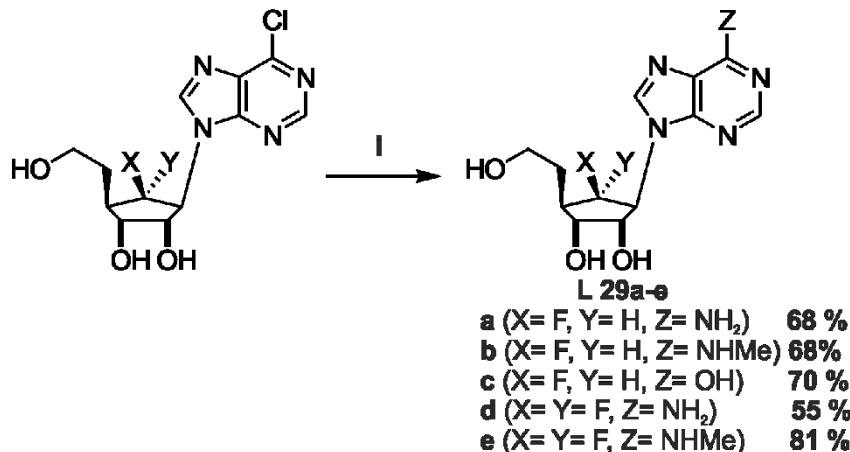
2.2 Možná protivirová aktivita nově vzniklých sloučenin

RNA viry mají RNA jako svůj genetický materiál a mnoho důležitých lidských patogenů má jednovláknovou RNA (ssRNA) ve svém genomu. Podle Baltimorovy klasifikace se rozlišují tři skupiny RNA virů na základě povahy jejich genomu a způsobu replikace, a sice:

- dvouvláknové RNA viry,
- viry ssRNA s negativní polaritou a
- viry ssRNA s pozitivní polaritou.

Viry ssRNA s pozitivní polaritou (+RNA) tvoří největší skupinu a obsahují mnoho lidských patogenů, jako je virus horečky dengue, hepatitidy C, koronavirus závažného akutního respiračního syndromu (SARS), koronavirus respiračního syndromu na Středním východě (MERS), Zika virus a virus chikungunya (CHIKV). Antivirová terapie u většiny těchto virů, které mají vážný dopad na lidské zdraví, stále chybí. Je tedy žádoucí vyvinout nová antivirová činidla pro léčbu virových onemocnění způsobených RNA viry.⁴⁴ Genom viru +RNA funguje jako mediátorová RNA (mRNA) a může být přímo převeden

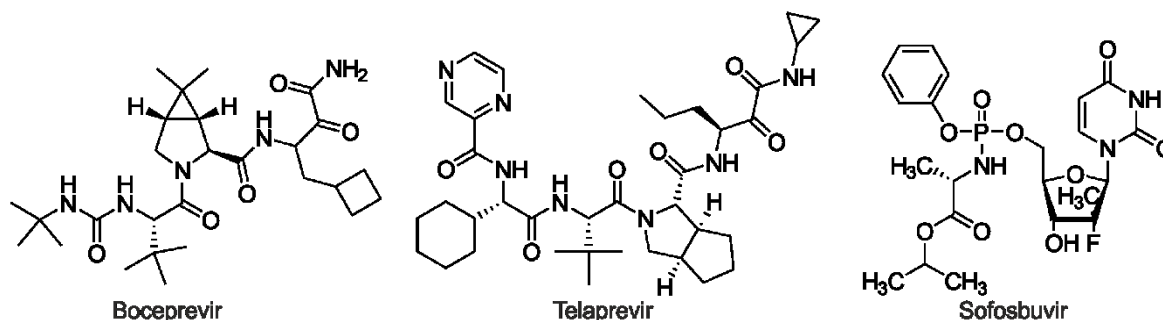
hostitelskými ribozomy do virových proteinů, které tvoří replikační komplexy a řídí replikaci virové RNA. Uzavírání virové RNA je obvykle prováděno jedním nebo více virovými proteiny, které používají S-adenosinmethionin (SAM) jako donor methyly. Buněčná S-adenosylhomocysteinová (SAH) hydroláza je klíčovým enzymem v regeneračním cyklu SAM a je nezbytný pro omezení virové mRNA. Inhibice hydrolázy SAH vede k akumulaci SAH, která inhibuje methylační reakce závislé na SAM, včetně reakcí vyžadovaných pro zránění virové RNA. Hydroláza SAH je tedy slibným cílem pro vývoj širokospektrálních antivirových látek.⁴⁵ Syntézu 6'-fluor-5'-homoaristeromycinových analogů, které kombinují homologaci atomu uhlíku v poloze 5' s bioisosterickým vytěsněním atomu vodíku fluorem v poloze 6' popisují autoři Shin a kolektiv.⁴⁶ Tyto nukleosidy byly syntetizovány z D-ribózy pomocí Michaelovy reakce, stereoselektivní elektrofilní fluorace a lineárního navázání purinové báze (Obrázek 18). Mezi testovanými sloučeninami vykazoval 6-β-fluor-homoaristeromycin (L 29a) silnou anti-CHIKV aktivitu ($EC_{50} = 0,12 \mu\text{M}$) bez znatelné cytotoxicity v koncentraci do $250 \mu\text{M}$. 6-β-fluor-homoaristeromycin může být slibnou novou šablonou pro vývoj anti-CHIKV látek. Ostatní syntetizované sloučeniny neměly výraznou anti-CHIKV aktivitu.



Syntéza nukleosidů: i) NH₃/t-BuOH, 90°C, 3 h **a**, nebo NH₃/MeOH, 70°C, přes noc **d**, 40% aq. MeNH₂, 80°C, 5 h, **b a e**, HCl, 1,4-dioxan, reflux, přes noc **c**

Obrázek 18: Syntéza 6'-fluor-5'-homoaristeromycinových analogů.

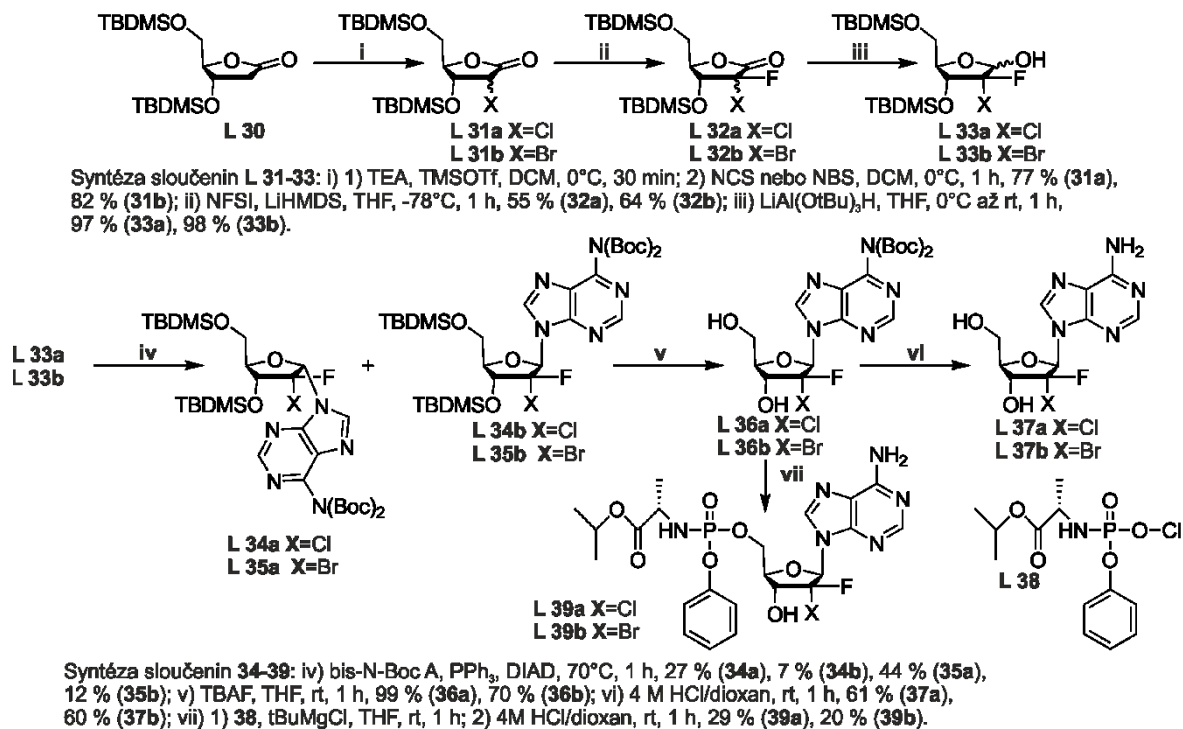
Podle WHO (Světová zdravotnická organizace) je na celém světě chronicky infikováno 71 milionů lidí virem hepatitidy C (HCV), která se může vyvinout v cirhózu nebo rakovinu jater.⁴⁷ Od roku 2011 a prvních schválených antivirových s přímým působením kyseliny D asparagové (DAA), tedy Bocepreviru a Telapreviru, došlo k revoluci v léčbě infekce hepatitidy C.



Obrázek 19: Schválená antivirotika Boceprevir, Telaprevir a Sofosbuvir.

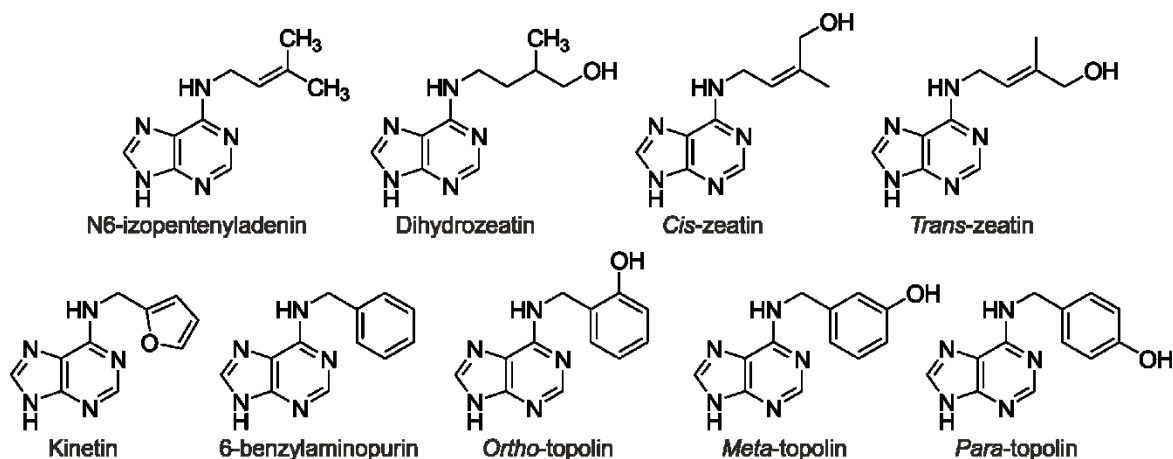
Mimo Boceprevir a Telaprevir, byl také mezi nukleosidovými analogy jako jediný schválený Sofosbuvir (Obrázek 19) a v této době je jedním z nejčastěji předepisovaných léčiv pro léčbu infekce hepatitidy C. Protože nukleosidové analogy zaměřující se na HCV NS5B polymerázu obecně vykazují širší aktivitu proti hepatitidě C genotypům (GT) spolu s příznivým bezpečnostním profilem a vysokou genetickou bariérou vůči rezistenci, zůstávají zlatým standardem pro léčbu HCV.⁴⁸ Na základě úspěchů 2'-halogenových sloučenin se Ovadia a spol.⁴⁹ zaměřili na vývoj nových 2'-dihalogen nukleosidů jako potenciálních antiHCV látek. Nejprve byla provedena diastereoselektivní syntéza klíčových 2-chlor-2-fluor a 2-brom-2-fluorlaktolů L 33a a L 33b (Obrázek 19), ze kterých byly dále připraveny odpovídající pyrimidinové a purinové nukleosidové analogy. Chráněný lakton L 30 byl nejprve převeden na odpovídající trimethylsilylenolether a poté následovala přímá chlorace nebo bromace v přítomnosti buď *N*-chlorsukcinimidu nebo *N*-bromsukcinimidu za vzniku odpovídajících chlor a brom laktonů L 31a a L 31b ve formě diastereomerních směsí. Následná fluorace poskytla selektivně dihalogenlaktony L 32a a L 32b a redukcí $\text{LiAl}(\text{OtBu})_3\text{H}$ v tetrahydrofuranu byly získány odpovídající laktoly L 33a a L 33b. Purinové nukleosidy L 34 a L 35 byly získány reakcí laktolů L 33a a L 33b s bis-*N*-Boc chráněným adeninem v přítomnosti DIAD a PPh_3 . Látky vznikly jako směs α/β anomerů v poměru 4:1, kdy jednotlivé anomery byly rozděleny pomocí flash chromatografie na silikagelu. Deprotekce silylových skupin pomocí TBAF poskytla bis-*N*-Boc chráněné deriváty adeninu L 36a a L 36b, které byly zpracovány 4M roztokem HCl v dioxanu za vzniku adenosinových nukleosidů L 37a a L 37b. Monofosfátová proléčiva L 39a a L 39b byla získána reakcí chráněných meziproductů L 36a a L 36b se sloučeninou L 38 v přítomnosti *tert*-butylmagneziumchloridu. Z klíčových dihalogenlaktolů L 33a a L 33b bylo připraveno šestnáct derivátů. Bohužel u všech těchto sloučenin byla pozorována cytotoxicita na lidské buněčné linii, což vylučuje další vývoj zde popisovaných

látek jako léčiv proti hepatitidě typu C. Cytotoxicita je pravděpodobně způsobena přítomností atomu fluoru v beta poloze příslušného sacharidu.



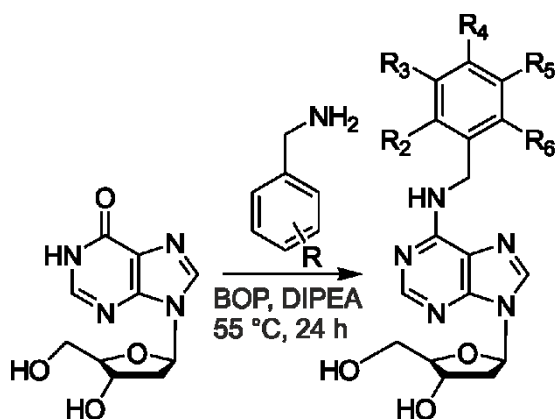
Obrázek 20: Schéma přípravy purinových nukleosidových analogů.

Rostlinné hormony cytokininy, N6 substituované deriváty purinové báze adeninu, jsou zodpovědné za mnoho událostí v růstu a vývoji rostlin, jako je dělení buněk, iniciace výhonků, apikální dominance a stárnutí listů. Podle substituce na atomu dusíku v poloze 6 adeninového skeletu, lze cytokininy rozdělit do dvou hlavních skupin: izoprenoidní a aromatické. Mezi izoprenoidní patří například N6-izopentenyladenin (iP), Dihydrozeatin, *Cis*-zeatin (cZ), *Trans*-zeatin (tZ) a mezi aromatické Kinetin (K), 6-benzylaminopurin (BAP) a hydroxylované deriváty topoliny (*Ortho*-, *Meta*-, *Para*-topolin).⁵⁰ Strukturální vzorce uvedených cytokininů jsou znázorněny na Obrázku 21.



Obrázek 21: Vzorce příslušných izoprenoidních a aromatických cytokininů.

BAP je jedním z neúčinnějších a cenově dostupných cytokininů používaných v mikropropagačních systémech a biotechnologiích. Avšak má nevýhody v některých kulturách jako jejich metabolit BAP-9-glukosid, se hromadí a jeho pomalé uvolňování může způsobit růstovou heterogenitu a inhibici růstu kořene.⁵¹ Jedním ze způsobů, jak překonat negativní účinky, je použití cytokininů konjugovaných v poloze N9 purinového kruhu. Tyto sloučeniny vykazují více divergentní metabolismus a poskytují nižší hladiny 9-glukosidu. V této práci byla série nových derivátů 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosyl purinu syntetizována jednostupňovou reakcí nechráněného 2'-deoxyinosinu s (1*H*-benzotriazol-1-yl)tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfátem (BOP), což vedlo k přeměně na O⁶-(benzotriazol-1-yl) deriváty. Pro tuto syntézu bylo použito Castrovo činidlo BOP, často používané při syntéze peptidů. Vědci zkoumali cytokininovou aktivitu na nové řadě substituovaných derivátů 6-benzylamino-2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosyl purinu a také jejich anti-senescenční (degradace chlorofylu), antioxidační a cytotoxickou aktivitu. Skupina Vlasty Matouškové⁵² zjistila, že přítomnost 2'-deoxyribosylové skupiny významně přispěla k anti-senescenční aktivitě ve srovnání s jejich ribosidy nebo bázemi. Například sloučeniny L 30 a L 31 vykazovaly zvyšující se aktivitu (se zvyšující se koncentrací) ve všech třech biologických testech cytokininové aktivity oproti BAP. Deriváty obsahující hydroxylovou skupinu také vykazovaly značnou antioxidační aktivitu, zejména sloučeniny L 32 a L 33. Antivirové a protozoální testy budou provedeny podle autorů v budoucnu.



Sloučenina	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	Izolovaný výtěžek (%)
L 30	H	OH	H	H	H	69
L 31	H	OMe	H	H	H	38
L 32	OH	OMe	H	H	H	21
L 33	H	OH	OMe	H	H	30

Obrázek 22: Jednostupňová syntéza řady 6-substituovaných 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosyl purinů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a vybavení

Teploty tání (t_f) uvedené v diplomové práci byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) využívaná pro monitorování reakcí byla prováděna na deskách typu Alugram Sil G/UV₂₅₄ firmy Macherey-Nagel. Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel od firmy Macherey-Nagel. Infračervená spektra (IR) byla měřena na přístroji Spektrometr FTIR ALPHA-T (Bruker) v podobě KBr tablet. Při výpisu spekter z IR byly využity následující zkratky charakterizující intenzitu absorpčních pásů: s (silná), m (střední), w (slabá), případně také šířku pásu: b (široký pás). Vodíková spektra z nukleární magnetické rezonance (¹H NMR) byla měřena na přístroji JEOL ECZ 400 s pracovní frekvencí 399,78 MHz. Inertními standardy byly rozpouštědla ¹H: $\delta(\text{reziduální CHCl}_3) = 7,27 \text{ ppm}$; $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2,50 \text{ ppm}$. Pro účel interpretace vodíkových spekter byly použity následující zkratky: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet). Kvalitativní analýza reakčních směsí a finálních látek byla provedena pomocí plynového chromatografu spojeného s hmotnostním spektrometrem vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Shimadzu GC-MS QP2010). Plynový chromatograf byl vybaven kolonou EQUITY 1 (30 m \times 0,32 mm \times 1,0 μm). Pro analýzy byl zvolen následující teplotní program: 100 °C/7 min; 30 °C/min s teplotou nástřiku 250 °C. Nosný plyn: He, iontový zdroj: 200 °C, 70 eV. Všechny GC-MS analýzy byly provedeny za lineární konstantní rychlosti 52 cm/s. Ve výpisech signálů z hmotnostních spekter jsou uvedeny hodnoty signálů s relativním zastoupením nejméně 5 %, vyjma molekulových iontů. Hodnoty intenzit vybraných fragmentů jsou uvedeny v závorce za hodnotou m/z . ESI-IT-MS analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) vybaveném elektrosprejovým iontovým zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním i negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Ostatní parametry měření byly následující: napětí na kapiláře $\pm 4,2 \text{ kV}$; teplota sušícího plynu (220 °C); průtok sušícího plynu (6 $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$); tlak rozprašovacího plynu (55,16 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů. Tandemová hmotnostní spektra byla po izolaci vybraného iontu měřena pomocí kolizí indukované disociace (CID). Mikrovlnami asistované syntézy byly

provedeny na mikrovlnném reaktoru Discovery SP od firmy CEM. Reakce byly prováděny v roztoku a za zvýšeného tlaku. Podmínky použité pro jednotlivé reakce jsou popsány v diskuzní části této práce (kapitola 4).

Výchozí látka 6-chlor-9*H*-purin, reakční činidla a rozpouštědla pro syntézy byly získány z komerčních zdrojů a použity bez dalších úprav.

3.2 Syntéza nových 6,9-disubstituovaných purinů

3.2.1 Alkylace 6-chlor-9*H*-purinu

Do baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 1,0 g (6,5 mmol) 6-chlor-9*H*-purinu, následně bylo do baňky přidáno 15 ml dimethylsulfoxidu, ve kterém byl 6-chlorpurin rozpuštěn. Baňka byla zchlazena na 15 °C ve vodní lázni a poté bylo do baňky přidáno 2,7 g (19,4 mmol) K₂CO₃ a 4,8 g (32,3 mmol) 1-bromcyklopentanu, nebo 5,5 g (32,3 mmol) 2-jodpropanu. Reakce byla prováděna při teplotě 15–18 °C a její průběh byl monitorován pomocí TLC. Reakce byla ukončena po 8 hodinách, její obsah byl naředěn destilovanou vodou a vodný podíl byl extrahován 6 × 15 ml ethyl-acetátu. Organické podíly byly spojeny a dále promyty roztokem chloridu sodného (2 × 15 ml) a sušeny nad síranem sodným. Odpařením na vakuové odparce (RVO) byl získán surový produkt v podobě bezbarvého krystalického prášku, který byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 8/1, v/v). Tím došlo k oddělení vznikajících N7 a N9 isomerů.

6-Chlor-9-isopropyl-9*H*-purin (2)

Požadovaný produkt byl získán ve výtěžku 1,18 g (93 %), ve formě bezbarvého krystalického prášku; $t_f = 152\text{--}155\text{ }^\circ\text{C}$; ($t_{f(\text{lit})} = 145\text{--}151\text{ }^\circ\text{C}^{53}$, $107\text{--}109\text{ }^\circ\text{C}^{54}$).

¹H NMR (CDCl₃): δ 1,69 (d, $J = 7,0$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂); 4,92 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 8,27 (s, 1H, NC⁸HN); 8,76 (s, 1H, NC²HN) ppm. IR (KBr): 3110(m), 3052(m), 2965(m), 1594(s), 1545(s), 1496(m), 1430(m), 1384(m), 1233(m), 1139(w), 1008(m), 862(w), 789(m) cm⁻¹. GC-EI-MS ($t_R = 13,2$ min); m/z (%): 198 ((³⁷Cl)M⁺, 12), 196 ((³⁵Cl)M⁺, 37), 181 (12), 156 ((³⁷Cl)M⁺-C₃H₆, 32), 155 (16), 154 ((³⁵Cl)M⁺-C₃H₆, 100), 134 (14), 119 (47), 92 (12), 86 (5), 65 (7), 43 (18), 42 (8), 41 (28).

6-Chlor-9-cyklopentyl-9H-purin (3)

Požadovaný produkt byl získán ve výtěžku 1,25 g (87 %), ve formě bezbarvého krystalického prášku; $t_f = 94\text{--}96\text{ }^\circ\text{C}$; ($t_{f(\text{lit})} = 97\text{ }^\circ\text{C}$)⁵⁵.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,72 (m, 2H, cPe); 1,90 (m, 2H, cPe); 2,07 (m, 2H, cPe); 2,20 (m, 2H, cPe); 4,99 (m, 1H, CHcPe); 8,77 (m, 2H, NC²HN, NC⁸HN) ppm. IR (KBr): 3440 (w), 3098 (m), 3066 (m), 2960 (m), 1591 (s), 1558 (s), 1489 (m), 1391 (m), 1335(s), 1223(s), 1148(m), 956(m), 936(m), 856(m), 792(m), 637(m) cm⁻¹. GC-EI-MS ($t_R = 10,7$ min); m/z (%): 224 (³⁷Cl)M⁺, 5), 222 (³⁵Cl)M⁺, 16), 183 (5), 181 (16), 157 (33), 156 (11), 155 (100), 154 (12) 119 (23), 92 (6), 68 (11), 67 (22), 65 (5), 41 (34).

3.2.2 Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce atomu chloru na C6

Sloučenina **2** byla navážena a rozpuštěna v 6 ml ethanolu v 10 ml zkumavce určené pro mikrovlnné syntézy. Do reakční směsi byl přidán dvoumolární přebytek příslušného aromatického aminu. Po uzavření zkumavky speciálním septem, byla vložena tato do mikrovlnného reaktoru opatřeného teflonovou bezpečnostní nádobou. Pomocí softwaru Synergy-D byly nastaveny podmínky reakce (tlak 21 bar, výkon 200 W, teplota 150 °C, čas 15 minut) a následně spuštěna reakce. Po ukončení a zchlazení byla reakční směs analyzována pomocí TLC a také byl odebrán vzorek na GC-MS. Následovalo naředění reakční směsi destilovanou vodou a následná extrakce vodné fáze 6 × 15 ml ethyl-acetátu. Organické podíly byly spojeny a dále promyty roztokem chloridu sodného (2 × 15 ml) a sušeny nad síranem sodným. Odpařením na vakuové odparce (RVO) byl získán surový produkt, který byl přečištěn sloupcovou chromatografií.

N-Fenyl-9-isopropyl-9H-purin-6-amin (4)

Sloučenina **4** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-isopropyl-9H-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), anilin (142 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 87 mg (45 %), ve formě oranžového oleje; $t_f = 25\text{ }^\circ\text{C}$; ($t_{f(\text{lit})} = 74\text{--}76\text{ }^\circ\text{C}$)⁵⁶.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,56 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 4,81 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 7,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ph); 7,32 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H, Ph); 7,94 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ph); 8,39 (m, 2H, NC^2HN , NC^8HN); 9,77 (s, 1H, C^6NHPh) ppm. IR (KBr): 3388(m), 3297(m), 2978(m), 1702(w), 1623(s), 1581(s), 1498(m), 1468(m), 1327(m), 1231(m), 1144(w), 1011(m), 883(w), 751(m) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_{\text{R}} = 20,6$ min); m/z (%): 254 (10), 253 (M^+ , 64), 252 (54), 211 (21), 210 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$, 100), 156 (6), 129 (6), 119 (5), 104 (9), 103 (9), 92 (8), 77 (25), 51 (10), 43 (9), 41 (12). ESI-MS (pos.) m/z (%): 529,2 [$2 \cdot \text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (25); 276,0 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (17); 254,0 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$ (100). ESI-MS/MS (pos.) 254,0 m/z : 211,9 [$\text{M} + \text{H}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$] $^+$ (100).

***N*-4-Methylfenyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin (5)**

Sloučenina **5** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), 4-methylanilin (163 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 96 mg (47 %), ve formě žlutého krystalického prášku; $t_{\text{f}} = 153\text{--}160$ °C.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,55 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,28 (s, 3H, PhCH_3); 4,80 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 7,11 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph); 7,80 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph); 8,36 (m, 2H, NC^2HN , NC^8HN); 9,67 (s, 1H, C^6NHPh) ppm. IR (KBr): 3254(m), 3178(m), 3106(m), 2973(m), 2869(m), 1625(s), 1585(s), 1514(s), 1466(s), 1229(m), 1012(m), 944(w), 505(w), 710(w) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_{\text{R}} = 23,3$ min); m/z (%): 268 (11), 267 (M^+ , 70), 266 (52), 225 (26), 224 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$, 100), 209 (5), 118 (7), 117 (5), 106 (12), 91 (19), 98 (5), 77 (7), 65 (11), 43 (8), 41 (10). ESI-MS (pos.) m/z (%): 557,2 [$2 \cdot \text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (20); 290,0 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (13); 268,1 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$ (100). ESI-MS/MS (pos.) 268,1 m/z : 226,0 [$\text{M} + \text{H}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$] $^+$ (100).

***N*-4-Ethoxyfenyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin (6)**

Sloučenina **6** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), 4-ethoxyanilin (209 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou

chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 118 mg (52 %), ve formě světle hnědého krystalického prášku; $t_r = 114\text{--}126\text{ }^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_3$); 1,55 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 4,00 (dd, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{PhOCH}_2\text{CH}_3$); 4,79 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 6,88 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 7,77 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 8,32 (m, 2H, NC^2HN , NC^8HN); 9,62 (s, 1H, C^6NHPh) ppm. IR (KBr): 3412(w), 3286(w), 2979(m), 2874(w), 1615(s), 1582(m), 1514(s), 1474(s), 1391(m), 1303(m), 1233(m), 1048(m), 1006(m), 924(w), 796(w) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_r = 31,1$ min); m/z (%): 298(16), 297 (M^+ , 82), 296 (10), 269 (10), 268 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$, 49), 227 (16), 226 ($\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{12}$, 100), 198 (9), 120 (6), 119 (16), 108 (10), 93 (5), 92 (5), 80 (11), 65 (7), 43 (7), 41 (9). ESI-MS (pos.) m/z (%): 617,2 [$2 \cdot \text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (23); 465,7 [$3 \cdot \text{M} + \text{Ca}^{2+}$] $^{2+}$ (12); 320,1 [$\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (11); 298,1 [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$ (100). ESI-MS/MS (pos.) 298,1 m/z : 256,0 [$\text{M} + \text{H}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$] $^+$ (100).

***N*-4-Chlorfenyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-amin (7)**

Sloučenina **7** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navázek: 6-chlor-9-isopropyl-9*H*-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), 4-chloranilin (195 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 119 mg (54 %), ve formě nažloutlého krystalického prášku; $t_r = 156\text{--}159\text{ }^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1,56 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 4,81 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 7,36 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 8,01 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 8,41 (m, 2H, NC^2HN , NC^8HN); 9,97 (s, 1H, C^6NHPh); ppm. IR (KBr): 3421(w), 3268(m), 3192(m), 3052(m), 2983(m), 1629(s), 1581(s), 1493(s), 1409(m), 1372(m), 1311(m), 1232(m), 1085(m), 1015(m), 846(m) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_r = 26,5$ min); m/z (%): 289 ($(^{37}\text{Cl})\text{M}^+$, 21), 288 (21), 287 ($(^{35}\text{Cl})\text{M}^+$, 69), 286 (35), 247 (11), 246 ($(^{37}\text{Cl})\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$, 38), 245 (35), 244 ($(^{35}\text{Cl})\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$, 100), 210 (6), 209 (12), 138 (10), 137 (8), 119 (6), 113 (5), 111 (16), 102 (5), 62 (8), 75 (17), 65 (6), 54 (7), 44 (6), 43 (22), 42 (7), 41 (25). ESI-MS (pos.) m/z (%): 597,1 [$2 \cdot (^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (5); 310,0 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{Na}^+$] $^+$ (7); 288,0 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{H}^+$] $^+$ (100). ESI-MS/MS (pos.) 288,0 m/z : 245,9 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{H}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$] $^+$ (100).

N-4-Bromfenyl-9-isopropyl-9H-purin-6-amin (8)

Sloučenina **8** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-isopropyl-9H-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), 4-bromanilin (262 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 132 mg (52 %), ve formě světle žlutého krystalického prášku; $t_r = 131\text{--}134\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,56 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, CH(CH $_3$) $_2$); 4,81 (m, 1H, CH(CH $_3$) $_2$); 7,48 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ph); 7,96 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ph); 8,42 (m, 2H, NC 2 HN, NC 8 HN); 9,97 (s, 1H, C 6 NHPh); ppm. IR (KBr): 3422(w), 3268(m), 3192(m), 2981(m), 1629(s), 1577(s), 1488(s), 1398(m), 1310(m), 1229(m), 1013(m), 955(w), 843(w), 784(w), 647(m) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_r = 31,0$ min); m/z (%): 334 (16), 333 (^{81}Br)M $^+$, 95), 332 (56), 331 (^{79}Br)M $^+$, 96), 330 (43), 291 (33), 290 (^{81}Br)M $^+$ -C $_3$ H $_6$, 100), 289 (34), 288 (^{79}Br)M $^+$ -C $_3$ H $_6$, 98), 210 (25), 209 (42), 184 (6), 183 (10), 182 (18), 181 (5), 157 (11), 156 (12), 155 (25), 129 (11), 119 (15), 114 (7), 108 (7), 105 (9), 104 (6), 103 (13), 102 (16), 93 (12), 92 (28), 91 (12), 90 (8), 77 (10), 76 (22), 75 (20), 67 (6), 66 (11), 65 (20), 64 (9), 63 (11), 54 (12), 50 (11), 43 (39), 42 (13), 41 (46). ESI-MS (pos.) m/z (%): 334,0 [^{81}Br]M+H $^+$] (98); 332,0 [^{79}Br]M+H $^+$] (100). ESI-MS/MS (pos.) 334,0 m/z : 291,9 [^{81}Br]M+H $^+$ -C $_3$ H $_6$] (100). ESI-MS/MS (pos.) 332,0 m/z : 289,9 [^{79}Br]M+H $^+$ -C $_3$ H $_6$] (100).

N-4-Fluorfenyl-9-isopropyl-9H-purin-6-amin (9)

Sloučenina **9** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-isopropyl-9H-purin (**2**) (150 mg; 0,76 mmol), 4-fluoranilin (170 mg; 1,52 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 103 mg (50 %), ve formě nažloutlého krystalického prášku; $t_r = 147\text{--}149\text{ }^\circ\text{C}$; ($t_{r(\text{lit})} = 139\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$).⁵⁷

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,55 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, CH(CH $_3$) $_2$); 4,80 (m, 1H, CH(CH $_3$) $_2$); 7,16 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 7,95 (dd, $J = 5,0$ Hz, 2H, Ph); 8,37 (s, 1H, NC 2 HN); 8,40 (s, 1H, NC 8 HN); 9,85 (s, 1H, C 6 NHPh) ppm. IR (KBr): 3180(w), 2972(m), 2874(w), 1625(s), 1597(s), 1508(s), 1469(s), 1328(m), 1226(s), 1154(w), 1010(m), 831(w), 786(w), 645(w), 522(w) cm^{-1} . GC-EI-MS ($t_r = 20,1$ min); m/z (%): 272 (10), 271 (M $^+$, 61), 270 (24), 229

(30), 228 ($M^+ - C_3H_6$, 100), 174 (5), 122 (11), 121 (10), 95 (16), 83 (5), 75 (7), 43 (10), 41 (13). ESI-MS (pos.) m/z (%): 565,2 [$2 \cdot M + Na^+$] $^+$ (19); 294,0 [$M + Na^+$] $^+$ (19); 272,0 [$M + H^+$] $^+$ (100). ESI-MS/MS (pos.) 272,0 m/z : 229,9 [$M + H^+ - C_3H_6$] $^+$ (100).

***N*-Fenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (10)**

Sloučenina **10** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (100 mg; 0,45 mmol), anilin (83 mg; 0,9 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 60/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 87 mg (69 %), ve formě bezbarvého krystalického prášku; $t_t = 154\text{--}156$ °C.

1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,72 (m, 2H, cPe); 1,90 (m, 2H, cPe); 2,05 (m, 2H, cPe); 2,18 (m, 2H, cPe); 4,91 (m, 1H, CHcPe); 7,03 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ph); 7,32 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H, Ph); 7,95 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ph); 8,38 (m, 2H, NC 2 HN, NC 8 HN); 9,77 (s, 1H, C 6 NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 32,9$ min); m/z (%): 280 (9), 279 (M^+ , 46), 278 (18), 238 (22), 212 (13), 211 (59), 210 ($M^+ - cPe$, 100), 156 (7), 129 (6), 119 (6), 104 (12), 103 (9), 93 (5), 92 (9), 77 (30), 67 (11), 66 (6), 65 (11), 51 (10), 41 (35).

***N*-4-Methylfenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (11)**

Sloučenina **11** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (100 mg; 0,45 mmol), 4-methylanilin (96 mg; 0,9 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/4, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 106 mg (80 %), ve formě nažloutlého krystalického prášku; $t_t = 128\text{--}130$ °C.

1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,71 (m, 2H, cPe); 1,90 (m, 2H, cPe); 2,05 (m, 2H, cPe); 2,17 (m, 2H, cPe); 2,27 (s, 3H, PhCH $_3$); 4,90 (m, 1H, CHcPe); 7,12 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph); 7,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph); 8,35 (m, 2H, NC 2 HN, NC 8 HN); 9,66 (s, 1H, C 6 NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 39,7$ min); m/z (%): 294 (10), 293 (M^+ , 52), 292 (18), 252 (19), 226 (12), 225 (61), 224 ($M^+ - cPe$, 100), 118 (9), 117 (6), 106 (15), 91 (22), 79 (6), 77 (9), 67 (11), 65 (16), 44 (6), 41 (33).

***N*-4-Ethoxyfenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (12)**

Sloučenina **12** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (100 mg; 0,45 mmol), 4-ethoxyanilin (123 mg; 0,9 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/8, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 91 mg (63 %), ve formě nahnědlého krystalického prášku; $t_f = 141\text{--}147\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃); 1,71 (m, 2H, cPe); 1,89 (m, 2H, cPe); 2,04 (m, 2H, cPe); 2,17 (m, 2H, cPe); 4,00 (dd, $J = 6,9$ Hz, 2H, OCH₂CH₃); 4,89 (m, 1H, CHcPe); 6,89 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 7,81 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, Ph); 8,35 (m, 2H, NC²HN, NC⁸HN); 9,66 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 59,4$ min); m/z (%): 324 (7), 323 (M⁺, 41), 294 (16), 255 (11), 227 (15), 226 (M⁺-C₇H₁₄, 100), 198 (7), 120 (9), 119 (22), 108 (15), 93 (8), 92 (7), 80 (21), 67 (15), 65 (10), 53 (10), 44 (11), 41 (41).

***N*-4-Chlorfenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (13)**

Sloučenina **13** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (150 mg; 0,67 mmol), 4-chloranilin (171 mg; 1,34 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 30/1, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 146 mg (69 %), ve formě narůžovělého krystalického prášku; $t_f = 139\text{--}142\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,72 (m, 2H, cPe); 1,90 (m, 2H, cPe); 2,05 (m, 2H, cPe); 2,18 (m, 2H, cPe); 4,91 (m, 1H, CHcPe); 7,37 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 8,02 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, Ph); 8,40 (m, 2H, NC²HN, NC⁸HN); 9,97 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 47,3$ min); m/z (%): 315 ((³⁷Cl)M⁺, 14), 314 (12), 313 ((³⁵Cl)M⁺, 40), 312 (6), 274 (6), 272 (18), 248 (6), 247 (25), 246 ((³⁷Cl)M⁺-cPe 44), 245 (83), 244 ((³⁵Cl)M⁺-cPe, 100), 210 (7), 209 (9), 182 (6), 138 (12), 137 (10), 119 (7), 111 (20), 102 (6), 99 (6), 92 (10), 91 (5), 77 (5), 75 (16), 69 (7), 67 (26), 66 (10), 65 (14), 54 (13), 53 (12), 45 (5), 44 (9), 42 (7), 41 (85).

***N*-4-Bromfenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (14)**

Sloučenina **14** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (100 mg; 0,45 mmol), 4-bromanilin (155 mg; 0,9 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/8, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 124 mg (77 %), ve formě nažloutlého krystalického prášku; $t_r = 143\text{--}148\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,72 (m, 2H, cPe); 1,91 (m, 4H, cPe); 2,05 (m, 2H, cPe); 2,18 (m, 2H, cPe); 4,92 (m, 1H, CHcPe); 7,49 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ph); 7,97 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, Ph); 8,40 (m, 2H, NC 2 HN, NC 8 HN); 9,97 (s, 1H, C 6 NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 58,8$ min); m/z (%): 360 (6), 359 ($(^{81}\text{Br})\text{M}^+$, 35), 358 (11), 357 ($(^{79}\text{Br})\text{M}^+$, 38), 318 (11), 316 (12), 292 (7), 291 (48), 290 ($(^{81}\text{Br})\text{M}^+\text{--cPe}$, 59), 289 (52), 288 ($(^{79}\text{Br})\text{M}^+\text{--cPe}$, 51), 210 (18), 209 (24), 183 (6), 182 (11), 157 (8), 156 (10), 155 (16), 129 (7), 119 (12), 114 (6), 108 (6), 103 (8), 102 (10), 93 (7), 92 (21), 91 (10), 77 (9), 76 (14), 75 (14), 69 (10), 68 (6), 67 (32), 66 (11), 65 (21), 64 (6), 63 (7), 54 (13), 53 (12), 52 (5), 51 (6), 50 (7), 44 (10), 43 (6), 42 (10), 41 (100).

***N*-4-Fluorfenyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-amin (15)**

Sloučenina **15** byla připravena podle obecného postupu z výchozích navážek: 6-chlor-9-cyklopentyl-9*H*-purin (**3**) (150 mg; 0,67 mmol), 4-fluoranilin (150 mg; 1,34 mmol), ethanol (6 ml). Reakce probíhala podle podmínek uvedených v obecném postupu. Sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/8, v,v) byl získán požadovaný čistý produkt ve výtěžku 164 mg (82 %), ve formě nahnědlého krystalického prášku; $t_r = 133\text{--}134\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,72 (m, 2H, cPe); 1,91 (m, 4H, cPe); 2,05 (m, 2H, cPe); 2,18 (m, 2H, cPe); 4,91 (m, 1H, CHcPe); 7,16 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ph); 7,94 (dd, $J = 5,0$ Hz, 2H, Ph); 8,37 (m, 2H, NC 2 HN, NC 8 HN); 9,85 (s, 1H, C 6 NHPh) ppm. GC-EI-MS ($t_R = 20,1$ min); m/z (%): 298 (7), 297 (M^+ , 40), 296 (6), 256 (20), 230 (13), 229 (77), 228 ($\text{M}^+\text{--cPe}$, 100), 174 (6), 122 (15), 121 (12), 95 (20), 83 (7), 75 (8), 67 (15), 54 (9), 53 (5), 44 (6), 41 (47).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Komentář k diskuzní části

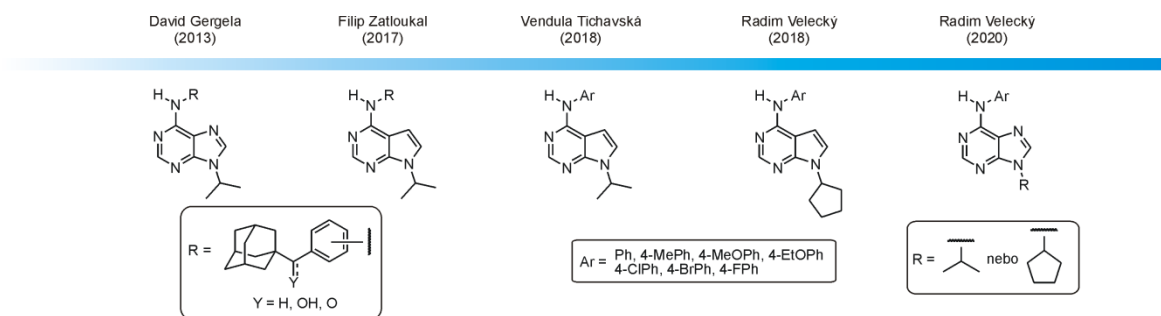
Tato diplomová práce svým zaměřením zapadá do oblasti chemie, která je mnoho let na Ústavu chemie studována. Řeč je o syntéze di- nebo trisubstituovaných derivátů purinu, případně jeho bioisosterů, které jsou postupně syntetizovány s cílem prozkoumat jejich možnou biologickou aktivitu.

V minulých letech byla pozornost věnována především syntéze nových derivátů purinu a pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu s adamantanovým skeletem. Přípravu 6,9-disubstituovaných purinů obsahujících na C6 aromatické aminy s adamantanovým skeletem (obecná struktura je uvedena na Obrázku 23) popsal ve své diplomové práci David Gergela,⁵⁴ Na jeho práci přímo navázal Filip Zatloukal, který ve své diplomové práci popsal syntézu 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů obsahujících aromatické aminy s adamantanovým skeletem v poloze 4 (Obrázek 23).⁵⁸ Následovala syntéza další série 4,7-disubstituovaných derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu, které se věnovala ve své diplomové práci Vendula Tichavská,⁵⁹ která se od svých předchůdců odlišovala použitím běžně dostupných aromatických aminů, namísto aromatických aminů obsahujících adamantanový skelet, kdy tyto substituovala do polohy 4 (Obrázek 23).

Předložená diplomová práce plynule navazuje na moji bakalářskou práci, v rámci níž jsem připravoval sérii 4,7-disubstituovaných derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu obsahující na C4 komerčně dostupné aromatické aminy (stejně jako ve své diplomové práci použila Vendula Tichavská), přičemž rozdíl spočíval v navázání cyklopentylového, namísto propan-2-ylového, substituentu na N7 (Obrázek 23).⁶⁰ Cílem této práce pak bylo připravit sérii 6,9-disubstituovaných purinů, kdy v poloze C6 měl být nahrazen atom chloru pomocí komerčně dostupných aromatických aminů a v poloze N9 měl být umístěn buď propan-2-ylový nebo cyklopentylový substituent (Obrázek 23).

Jelikož 10.3. 2020 došlo k vydání mimořádných opatření k prevenci šíření COVID-19, bylo přistoupeno k přerušení všech činností studentů na půdě fakulty technologické UTB. Počínaje 11. 3. 2020 začal platit zákaz osobní přítomnosti studentů na studiu na vysoké škole. Z toho důvodu nebylo možné vykonávat jakoukoliv činnost na půdě fakulty. Úplné uzavření škol trvalo do 19.3., kdy byla povolena přítomnost studentům závěrečných ročníků magisterských oborů a z toho důvodu nebylo možné pokračovat v praktické části

diplomové práce. S ohledem na vzniklou situaci nebylo možné navštěvovat laboratoř a dokončit úplnou charakteristiku nově vzniklých sloučenin.

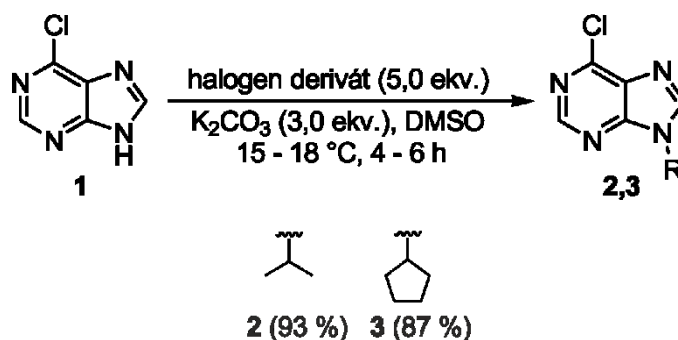


Obrázek 23: 6,9-disubstituované puriny a 4,7-disubstituované pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidiny připravované v naší výzkumné skupině.

4.2 Alkylace 6-chlor-9*H*-purinu

První krok potřebný k přípravě série 6,9-disubstituovaných purinů představovala alkylation komerčně dostupného 6-chlorpurinu do polohy N9 málo objemným substituentem, v případě této diplomové práce se jednalo o propan-2-yl a cyklopentyl.

Jelikož jsou puriny už dlouhou dobu zkoumané na Ústavu chemie, byla tato reakce prováděna ověřeným způsobem, který se používá při alkylation purinu či pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu. Výchozí 6-chlor-9*H*-purin (**1**) reagoval s příslušným halogenderivátem, a sice 2-jodpropanem nebo 1-bromcyklopentanem, který se do reakční směsi přidával v 5 molárním přebytku. Reakce probíhala v prostředí dimethylsulfoxidu za použití uhličitanu draselného jako báze (Obrázek 24).

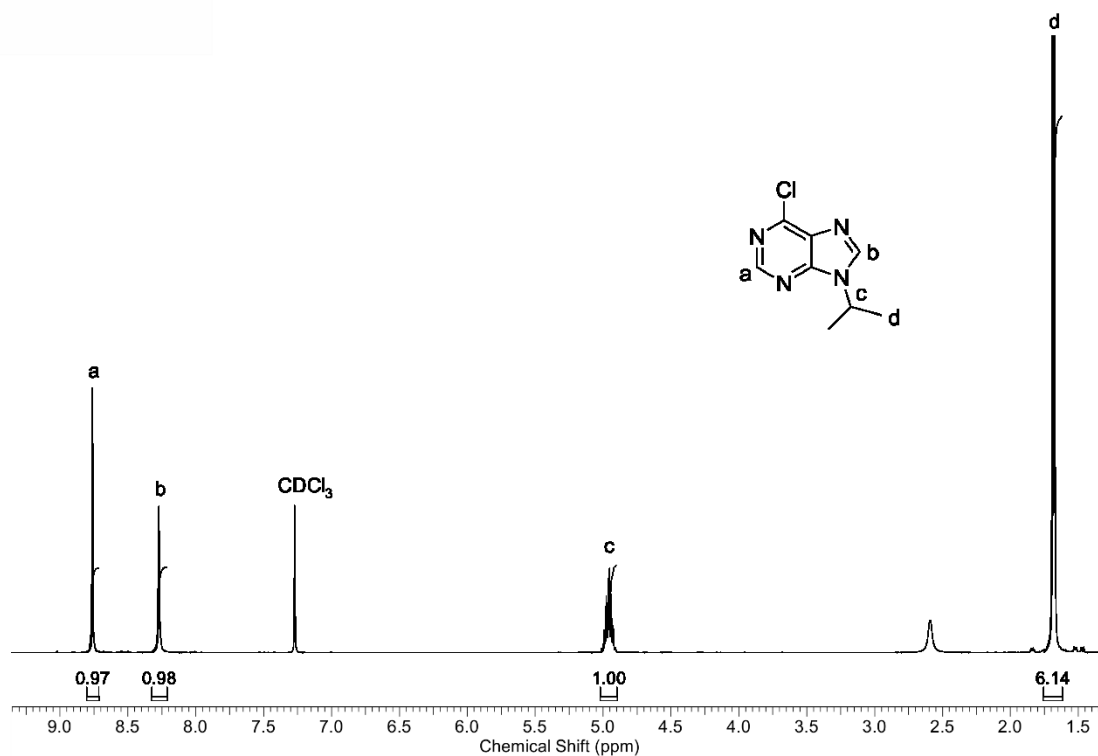


Obrázek 24: Alkylace 6-chlor-9*H*-purinu.

Reakce byla prováděna při teplotě 15–18 °C a její průběh byl monitorován pomocí TLC. Po spotřebování veškerého výchozího purinu **1**, což bylo pozorováno na TLC vrstvě, byla

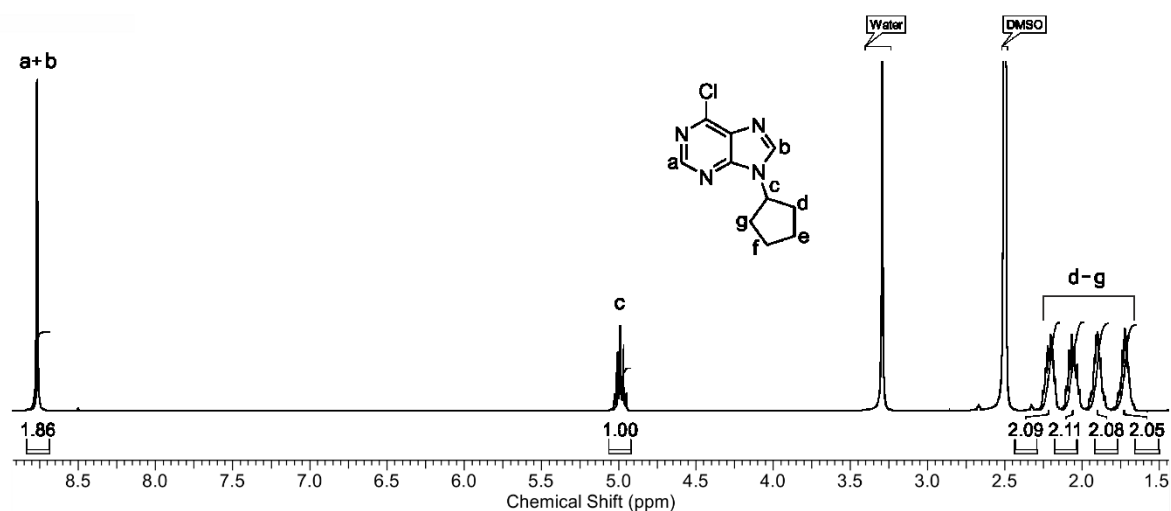
reakce ukončena a zpracována. Následovalo sušení organických podílů nad síranem sodným a odpaření rozpouštědla na rotační vakuové odparce (RVO). Jelikož při reakci vznikal mimo požadovaný N9 substituovaný také N7 substituovaný produkt, bylo nutné přistoupit k jejich rozdělení pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, chloroform/metanol, 8/1, v/v). Přechištěním byly získány požadované sloučeniny **2** a **3** ve výtěžku 93 %, respektive 87 %.

Struktura a čistota obou připravených sloučenin byla potvrzena na základě běžně používaných spektrálních metod, v tomto případě nukleární magnetické rezonance a plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. V $^1\text{H-NMR}$ spektru sloučeniny **2** byly pozorovány celkem čtyři signály pocházejících z příslušné molekuly (Obrázek 25). V alifatické oblasti (1,67 ppm) lze vidět dublet odpovídající methylovým skupinám nacházejícím se na propan-2-ylovém substituentu (signál „d“) a dále je zde multiplet v oblasti 4,91–5,01 ppm pocházející z CH skupiny propan-2-ylu (signál „c“). V aromatické oblasti byly detekovány dva signály pocházející z purinového skeletu, prvním byl singlet s chemickým posunem 8,27 ppm s odpovídající atomu vodíku na C8 (signál „b“) a druhým singlet nacházející se v oblasti 8,76 ppm pocházející z atomu vodíku na C2 (signál „a“).



Obrázek 25: ^1H NMR spektrum sloučeniny **2**.

V ^1H NMR spektru sloučeniny **3** bylo pozorováno celkem 6 signálů pocházejících z příslušné molekuly (Obrázek 26). V alifatické oblasti (1,7–2,20 ppm) byly pozorovány čtyři multiplety odpovídající atomům vodíku (CH_2) cyklopentylového kruhu (signály „d–g“). Dále byl ve spektru přítomný multiplet s chemickým posunem $\sim 5,00$ ppm, který byl určen jako atom vodíku CH skupiny navázané na N9 purinového skeletu (signál „c“). Poslední signál nacházející se v aromatické oblasti (8,77 ppm) v sobě ukryval dva atomy vodíku („a“ a „b“) pocházející z purinového kruhu.



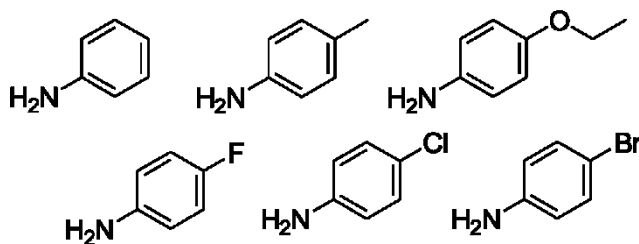
Obrázek 26: ^1H NMR spektrum sloučeniny **3**.

Obě výše uvedené reakce byly prováděny opakovaně s cílem připravit dostatečné množství sloučenin **2** a **3**, které byly v další experimentální činnosti použity jako výchozí látky pro syntézu uvažovaných sloučenin.

4.3 Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatické substituce

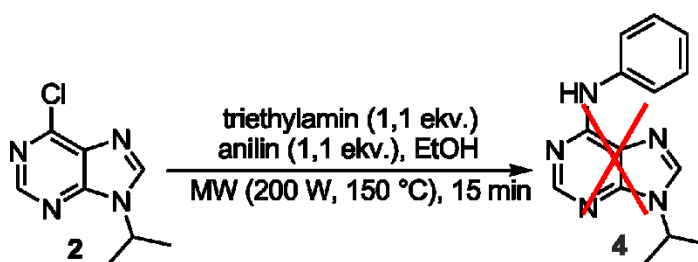
V následujícím kroku bylo pro získání zamýšlené série sloučenin přistoupeno k mikrovlnami asistované nukleofilní aromatické substituci atomu chloru v pozici C6 sloučenin **2** a **3**. Atom chloru byl nahrazen běžně dostupnými aromatickými aminy, vzájemně se lišící v poloze C4 aromatického kruhu oproti primární aminoskupině. Jako modelový substituent byl vybrán anilin. Jediným použitým aromatickým aminem, který vykazuje kladný indukční efekt a zvyšuje tak elektronovou hustotu, byl 4-methylanilin. Ostatní substituenty umístěné v *para* poloze vůči primární aminové skupině vykazovaly záporný indukční efekt, což znamená, že snižují elektronovou hustotu na aromatickém

jádře. Těmito aminy byly: 4-ethoxyanilin, 4-fluoranilin, 4-chloranilin a 4-bromanilin. Výše uvedené aromatické aminy jsou pro ilustraci znázorněny na Obrázku 27.



Obrázek 27: Aminy použité pro nukleofilní aromatickou substituci atomu chloru na C6.

Při prvním pokusu o provedení nukleofilní aromatické substituce byl jako modelový substituent použit anilin. Jelikož bylo našim cílem vyhnout se v některých případech komplikovanému a časově náročnému získávání uvažované sloučeniny pomocí sloupcové chromatografie, rozhodli jsme se nejprve provést mikrovlnami asistovanou nukleofilní substituci atomu chloru na C6 sloučeniny 2 v přítomnosti báze, kterou byl triethylamin použitý v 1,1 molárním přebytku. Ve stejném látkovém množství byl do reakční směsi přidán také anilin a jako rozpouštědlo byl použit ethanol. Reakce probíhala při teplotě 150 °C, výkonu 200 W a tlaku 21 bar po dobu 15 minut (Obrázek 28). Poté byl odebrán vzorek k analýze na GC-MS, kdy bylo zjištěno, že se v reakční směsi nachází pouze výchozí látka, nikoliv požadovaný produkt.

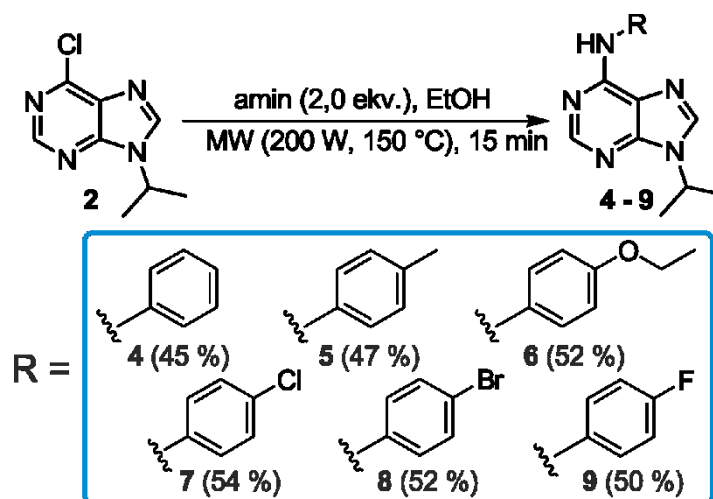


Obrázek 28: Vzorová reakce za použití triethylaminu.

Jelikož výše uvedený postup nevedl k požadovanému výsledku a nepomohlo ani zvýšení molárního množství báze, ani prodloužení doby provádění reakce v mikrovlnném reaktoru, bylo od tohoto postupu upuštěno a přistoupeno k postupu ověřenému z let minulých. Tímto jest provádění reakce za vyloučení báze a při použití příslušného aromatického aminu ve dvoumolárním přebytku vůči výchozímu purinu. Tento postup v sobě skýtá jednu zásadní nevýhodu, a to nutnost purifikace pomocí sloupcové chromatografie, kdy je od sebe

nezbytné oddělit aromatický amin vkládaný do reakční směsi v přebytku od požadovaného produktu. Ze zkušeností, které jsem získal při zpracování bakalářské práce, jsem se tomu chtěl původně vyhnout, jelikož například purifikace sloučenin obsahujících na benzenovém jádře halogen (Cl, Br, F) byla značně komplikovaná, zejména co do volby mobilní fáze zajišťující oddělení aromatického aminu a vznikajícího produktu.

Následovalo tedy provádění série experimentů s cílem nahradit atom Cl na C6 příslušným aromatickým aminem, kdy tento byl v reakční směsi použit ve dvoumolárním přebytku. Jako rozpouštědlo byl opět použit ethanol a rovněž podmínky v mikrovlnném rektoru zůstaly beze změny (Obrázek 29). Po ukončení příslušné reakce byl z reakční směsi odebrán vzorek pro analýzu GC-MS, která ve všech případech poukazovala na úplné zreagování výchozího purinu **2** a vznik uvažovaného produktu (sloučeniny **4–9**). Ve všech případech byl také v chromatogramu detekován zřetelný pík odpovídající příslušnému aromatickému aminu.

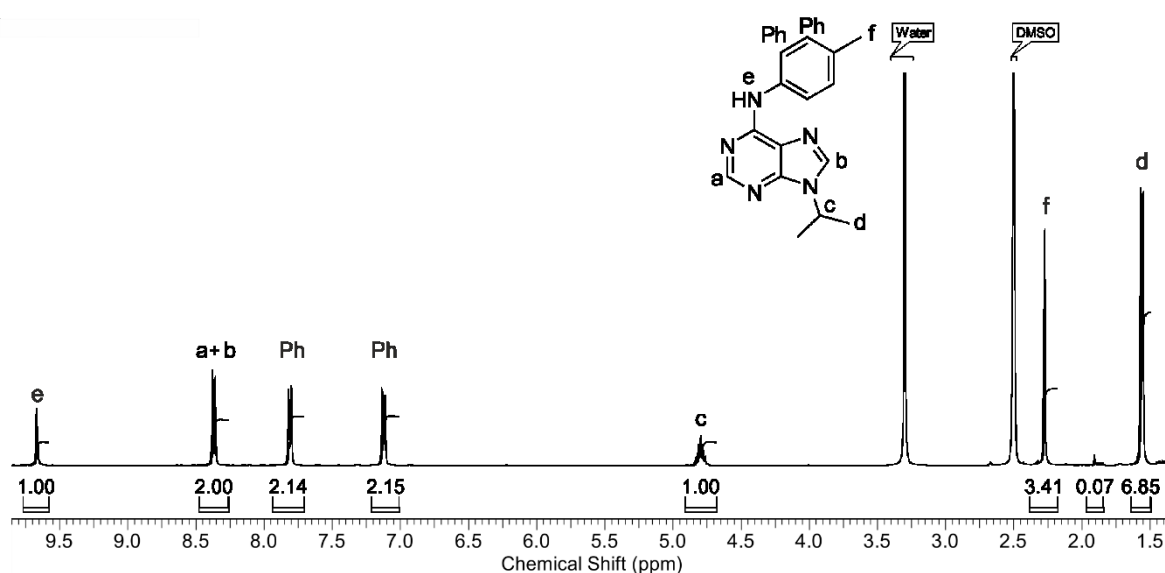


Obrázek 29: Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce sloučeniny **2**.

Po ukončení reakce a provedení analýzy na GC-MS, potvrzující úplné zreagování výchozího purinu **2** a vznik požadovaného produktu (sloučeniny **4–9**), byla příslušná reakční směs zpracována a následně bylo přistoupeno k přečištění pomocí sloupcové chromatografie. Nejvhodnější mobilní fází pro sloupcovou chromatografii se zdála být směs petrolether/ethyl-acetát (1/1, v/v). U všech provedených reakcí se podařilo odseparovat nezreagovaný přebytek aromatického aminu a získat požadované sloučeniny v uspokojivých výtěžích 45–52 % (Obrázek 29). Chromatografická čistota sloučenin **4–9** byla potvrzena pomocí analýz GC-MS provedených po čištění sloupcovou chromatografií,

jejich struktura pak byla navržena na základě výsledků získaných pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (ESI-MS).

V ^1H -NMR spektru sloučeniny **5** bylo pozorováno celkem sedm signálů (Obrázek 30). Z původního vodíkového NMR spektra sloučeniny **2** měly být viditelné čtyři signály a z nově navázaného substituentu by měly být pozorovány taky čtyři signály. To je způsobeno překryvem dvou signálů od vodíků z C2 a C8 purinového kruhu, které byly pozorovány ve stejné oblasti 8,36 ppm, a tudíž nebylo pozorováno osm samostatných předpokládaných signálů. V alifatické oblasti lze vidět celkem tři signály. V pásmu 1,55 ppm lze vidět dublet odpovídající methylovým skupinám nacházejícím se na propan-2-ylovém substituentu (signál „d“). Singlet (2,28 ppm) pochází z methylové skupiny navázané na aromatické jádře (signál „f“). Ještě je zde multiplet v oblasti 4,75–4,85 ppm pocházející od atomu vodíku CH skupinypropan-2-ylu (signál „c“). V aromatické oblasti byly detekovány čtyři signály, kdy dva dublety (7,11 a 7,80 ppm) pocházejí z fenylového kruhu substituovaného v pozici 4 (signály „Ph“). Dublet (8,36 ppm) lze přiřadit již zmiňovaným vodíkům na purinovém skeletu (signály „a“ a „b“) a poslední singlet nejvíce odstíněný (9,67 ppm) lze přiřadit vodíku z aminové skupiny NH (signál „e“). ^1H NMR spektra sloučenin **4**, **6**, **7**, **8** a **9** jsou znázorněna v Přílohách 1–5.



Obrázek 30: ^1H NMR spektrum sloučeniny **5**.

Vyjma NMR analýz byly za účelem potvrzení struktury připravených sloučenin provedeny také ESI-MS analýzy. Všechny sloučeniny byly analyzovány v pozitivním i negativním skenovacím módu, kdy uspokojivých výsledků bylo dosaženo, dle očekávání, pouze

v pozitivním skenovacím módu. Ve spektru prvního řádu byly v případě všech analyzovaných sloučenin, vyjma brom derivátu **8**, pozorovány tři jedenkrát nabitě ionty, které byly určeny jako protonovaná molekula ($[M+H]^+$), sodný adukt příslušné sloučeniny ($[M+Na]^+$) a dále pak sodný adukt dimeru dané látky ($[2\cdot M+Na]^+$). Naměřené hodnoty m/z odpovídající jednotlivým typům pozorovaných iontů a jejich srovnání s hodnotami teoretickými, jsou uvedeny v Tabulce 1.

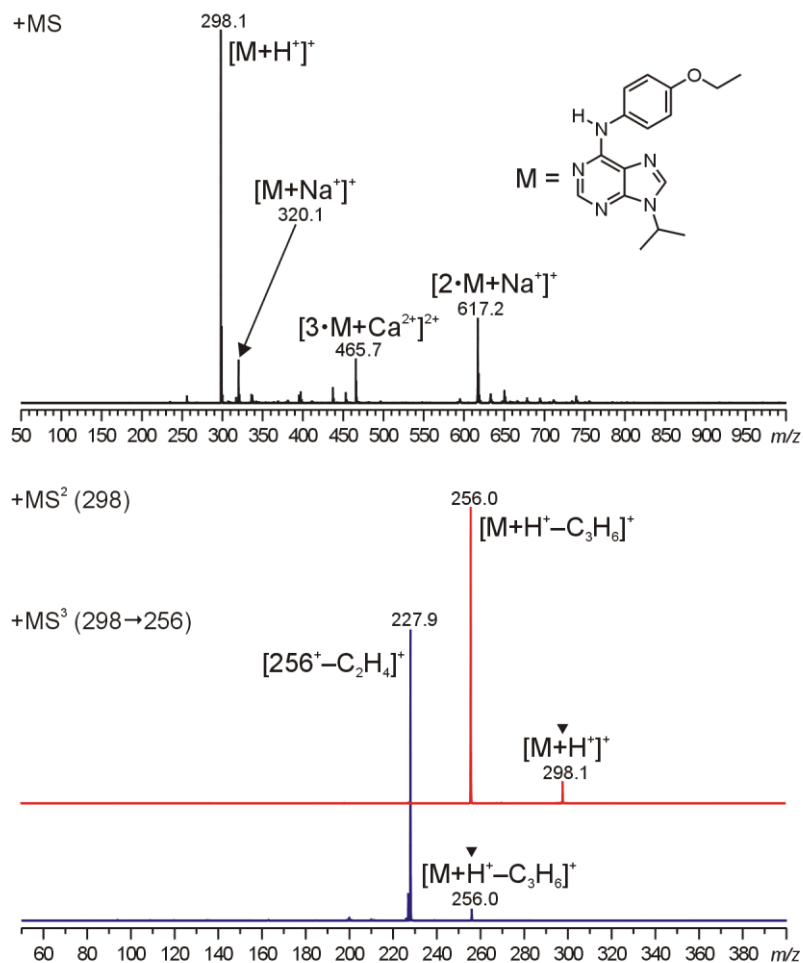
Tabulka 1: Srovnání naměřených a teoretických hodnot nabitých iontů příslušných sloučenin **4–9**.

Sloučenina	$[M+H]^+$		$[M+Na]^+$		$[2\cdot M+Na]^+$	
	teor. m/z	exp. m/z	teor. m/z	exp. m/z	teor. m/z	exp. m/z
4	254,1	254,0	276,1	276,0	529,3	529,2
5	268,1	268,1	290,1	290,0	557,3	557,2
6	298,2	298,1	230,2	320,1	617,3	617,2
7	288,1	288,0	310,1	310,0	597,2	597,1
8	332,0	332,0	354,0	NP	685,1	NP
9	272,1	272,0	294,1	294,0	565,2	565,2

NP = ion nebyl pozorován

Na Obrázku 31 jsou pro ilustraci znázorněna ESI-MS spektra získaná analýzou sloučeniny **6**. Jak je patrné ze spektra prvního řádu (+MS, černá barva), nacházely se v něm tři jedenkrát nabitě ionty o m/z 298, 310 a 617, což odpovídá protonované molekule, sodnému aduktu molekuly a sodnému aduktu dimeru sloučeniny **6**. Navíc byl ve spektru prvního řádu sloučeniny **6**, jakožto jedině ze všech analyzovaných látek, pozorován také dvakrát nabitý ion odpovídající vápenatému aduktu trimeru sloučeniny **6** (m/z 465,7).

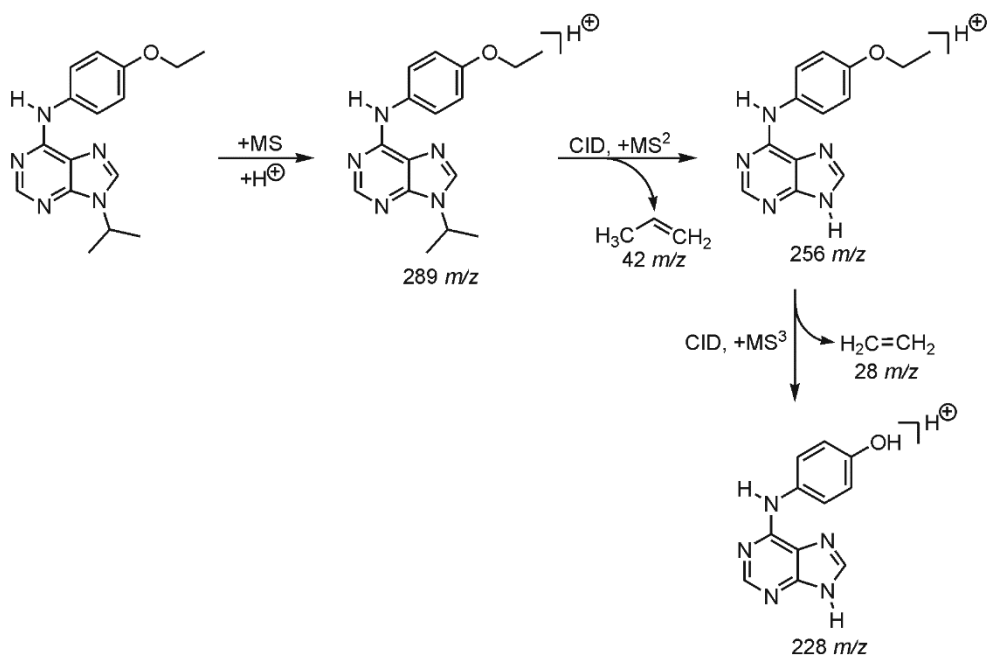
Izolací a následnou fragmentací, za podmínek kolizí indukované disociace (CID, z angl. collision-induced dissociation), požadovaného iontu, bylo studováno chování příslušné sloučeniny v plynné fázi. U všech analyzovaných látek byl v ESI-MS/MS spektru pozorován jediný fragmentační ion, ve všech případech vznikající neutrální ztrátou propenu (C_3H_6 , m/z 42) z mateřského iontu. ESI-MS/MS spektrum získané izolací a následnou fragmentací iontu $[M+H]^+$ sloučeniny **6**, je znázorněno na Obrázku 31 (+MS², červená barva), kdy je patrné, že z iontu o m/z 298 vznikal jediný ion o m/z 256. Hodnoty m/z iontů vznikajících fragmentací iontu $[M+H]^+$ sloučenin **4**, **5**, **7**, **8** a **9** jsou uvedeny v experimentální části (kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).



Obrázek 31: ESI-MS spektrum sloučeniny 6.

V případě sloučeniny 6 byla úspěšně provedena také fragmentace iontu o m/z 256, vznikajícího v MS/MS spektru, čímž bylo získáno MS³ (Obrázek 31, +MS³, modré spektrum). V tomto případě docházelo k neutrální ztrátě ethylenu (C_2H_4 , m/z 28) za vzniku iontu o m/z 228. Návrh fragmentace iontu $[M+H]^+$ sloučenin 6, znázorňující nejen výše popsané neutrální ztráty v MS/MS a MS³ spektrech, ale také návrh vznikajících struktur, je uveden na Obrázku 32.

Ve spektrech prvního řádu získaných v negativním skenovacím módu sice byl ve všech případech pozorován ion o m/z odpovídající deprotonované molekule ($[M-H]^-$), avšak ve velmi nízké intenzitě, což však nebylo, s ohledem na strukturu studovaných látek, nikterak překvapivé.



Obrázek 32: Návrh fragmentace iontu $[M+H]^+$ sloučeniny 6.

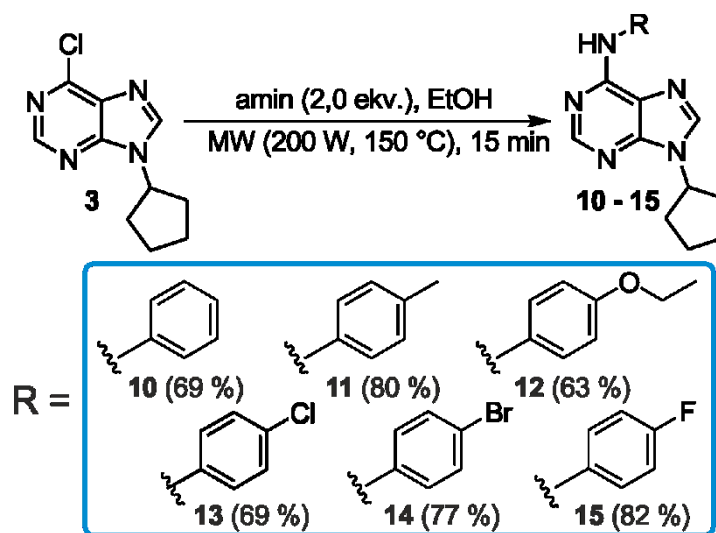
Jak je zmíněno výše, cílem předložené práce bylo připravit dvě série sloučenin, vzájemně se lišící substituentem v poloze 9 purinového skeletu. Po úspěšné přípravě a purifikaci sloučenin 4–9, tak bylo přistoupeno k syntéze druhé série látek, obsahujících na N9 místo propan-2-ylového, cyklopentylový substituent.

V tomto případě tedy byla ponechána reagovat sloučenina 3 s dvoumolárním přebytkem příslušného aromatického aminu v mikrovlnném reaktoru, a to za stejných podmínek jako tomu bylo v případě syntézy sloučenin 4–9. Úplné zreagování aminu bylo potvrzeno na GC-MS, kdy byl odebrán vzorek po ukončení příslušné reakce a podroben analýze. V chromatogramu byl pozorován zřetelný pík nově vzniklé sloučeniny a také pík odpovídající přebytku příslušného aromatického aminu.

Po potvrzení úplného zreagování výchozího purinu 3 a vzniku požadovaných produktů (sloučeniny 10–15), byly reakční směsi zpracovány a následně bylo přistoupeno k jejich přečištění pomocí sloupcové chromatografie. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii byly voleny individuálně podle příslušných sloučenin. Nejčastěji se jednalo o směsi petrolether/ethyl-acetát a chloroform/methanol (informace o přesném složení mobilní fáze použité k purifikaci dané směsi, je uvedeno pro každou sloučeninu v experimentální části). Ve všech případech se podařilo odseparovat nezreagovaný přebytek aromatického aminu a získat požadované sloučeniny ve výtěžcích pohybujících se v rozmezí 63–82 %

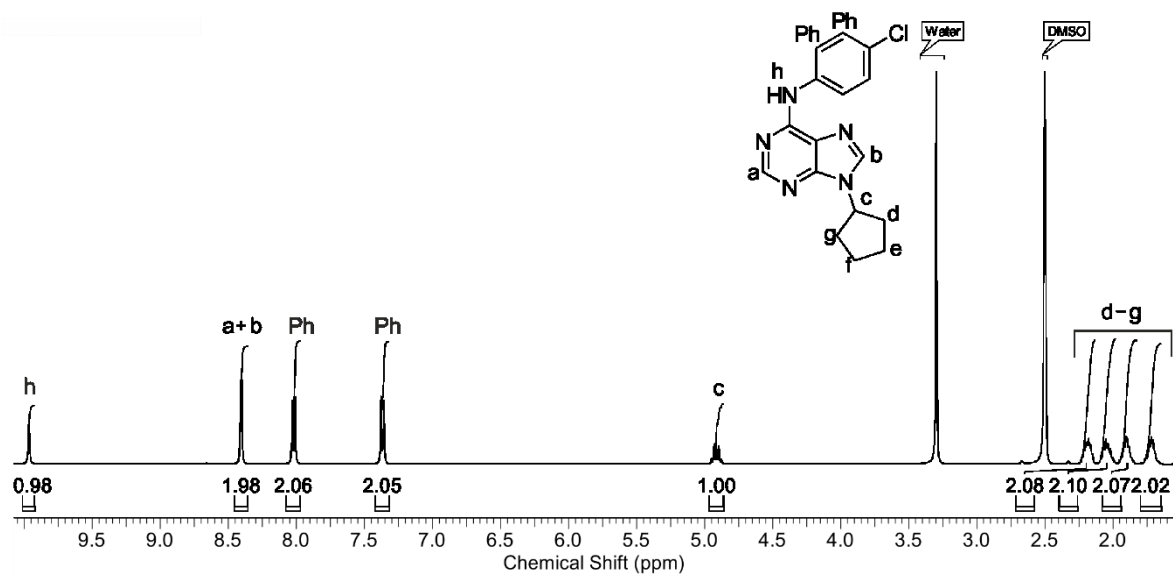
(Obrázek 33). Chromatografická čistota sloučenin **10–15** byla potvrzena pomocí analýz GC-MS provedených po čištění sloupcovou chromatografií.

Jelikož byly výše uvedené purifikační experimenty prováděny až v období po „znovuotevření“ vysokých škol, tedy po 20. 4. 2020, byla pro určení struktury sloučenin **10–15** použita, vyjma GC-MS, pouze nukleární magnetická rezonance.



Obrázek 33: Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce sloučeniny **3**.

Jako příklad je níže uvedeno ^1H NMR spektrum sloučeniny **13** (Obrázek 34), v němž bylo pozorováno celkem devět signálů. V alifatické oblasti se nachází, stejně jako u sloučeniny **3**, čtyři multiplety odpovídající atomům vodíku (CH_2) cyklopentylového kruhu (signály „d–g“). Dále byl ve spektru přítomný multiplet s chemickým posunem 4,91 ppm, který byl určen jako atom vodíku CH skupiny navázané na N9 purinového skeletu (signál „c“). Oproti sloučenině **3** byly dále pozorovány dva dublety (7,37 a 8,02 ppm), pocházející z fenylového kruhu (signály „Ph“), naznačující nejen přítomnost aromatického jádra, ale také jeho substituci v poloze *para*. Signál s chemických posunem 8,40 ppm lze přiřadit již zmiňovaným vodíkům na purinovém skeletu (signály „a“ a „b“). Posledním, nejvíce odstíněným, a ve spektru pozorovaným signálem, byl singlet (9,97 ppm), který lze přiřadit atomu vodíku pocházejícímu ze sekundární aminové skupiny, která na C6 nahradila původně se vyskytující atom chloru (signál „h“). ^1H NMR spektra sloučenin **10**, **11**, **12**, **14** a **15** jsou znázorněna v Přílohách (6–10).

Obrázek 34: ^1H NMR spektrum sloučeniny **13**.

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo připravit sérii 6,9-disubstituovaných purinů s doposud nepopsanou strukturou a následně provést jejich úplnou strukturní charakterizaci pomocí běžně dostupných instrumentálních metod.

Příprava 6,9-disubstituovaných purinů sestávala ze dvou kroků. Jako první bylo nutné připravit sloučeniny **2** a **3**, které byly později použity pro přípravu finálních sloučenin. Alkyací komerčně dostupného 6-chlor-9*H*-purinu (**1**) vznikla sloučenina **2**, kdy byl do pozice N9 zaveden propan-2-yl a sloučenina **3** vznikla po zavedení cyklopentyly do pozice N9 výchozího 6-chlor-9*H*-purinu. Reakce probíhaly v DMSO za použití uhličitanu draselného jako báze. Čisté sloučeniny **2** a **3** byly získány ve výtěžcích 93 a 87 %.

Následně byla provedena série mikrovlnami asistovaných nukleofilních aromatických substitucí atomu chloru na C6 sloučenin **2** a **3** předem vybranými primárními aromatickými aminy vzájemně se lišícími substituenty v poloze *para*. Do reakční směsi byl příslušný amin přidáván ve dvoumolárním přebytku. Zatímco sloučeniny **4–9** s propan-2-ylem vázaným v pozici N9 byly získány s uspokojivými výtěžky okolo 50 %, sloučeniny **10–15** s navázaným cyklopentylem byly získány ve výtěžcích okolo 70 %. Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí běžně dostupných spektrálních metod. Z důvodu výskytu epidemie COVID-19 na území České republiky a vyhlášení nouzového stavu Vládou ČR, došlo s platností od 11. března 2020 k pozastavení jakékoliv experimentální činnosti této práce se týkající, a to v okamžiku, kdy měla být provedena purifikace sloučenin **10–15**. K tomuto mohlo být přistoupeno až počínaje 20. dubnem 2020, proto byla struktura sloučenin **10–15** navrhována pouze na základě výsledků získaných pomocí GC-MS a ¹H NMR analýz.

Závěrem lze říct, že byla úspěšně provedena příprava celkem dvanácti 6,9-disubstituovaných purinů, z nichž deset nebylo doposud popsáno v literatuře. Tyto sloučeniny doplňují již dříve připravené série derivátů purinu a pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu, jimiž se Ústav chemie dlouho dobu zajímá. Sloučeniny **4–15** budou v blízké budoucnosti podrobeny testování na jejich potenciální biologickou aktivitu, a to ve spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. GEDYE, R., F. SMITH, K. WESTAWAY, H. ALI, L. BALDISERA, L. LABERGE a J. ROUSELL. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1986, **27**(3), 279-282.
2. LOUPY, A. Microwaves in organic synthesis: a clean and high-performance methodology. *Spectra Anal.* 1993, **22**, 175.
3. LARHED, M, A. HALLBERG. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2001, **6**, 406-416.
4. MAJETICH, G, R. HICKS. Applications of microwave-accelerated organic synthesis. *Radiat. Phys. Chem.* 1995, **45**, 567-579.
5. LOUPY, A., L. PERREUX, M. LIAGRE, K. BURLE a M. MONEUSE. Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanisms. *Pure Appl. Chem.* 2001, **73**(1), 164-166.
6. JUN, C.H, J. H. CHUNG, D.Y. LEE, A. LOUPY, S. CHATTI. Solvent-free chelation-assisted intermolecular hydroacylation: effect of microwave irradiation in the synthesis of ketone from aldehyde and 1-alkene by Rh(I)complex. *Tetrahedron Lett.* 2001, **42**, 4803-4805.
7. HAYES, Brittany L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. USA: CEM, 2002. ISBN 0-9722229-0-1.
8. GABRIEL, C., S. GABRIEL, E. H. GRANT, B. S. J. HALSTEAD, D. M. P. MINGOS. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.* 1998, **27**, 213-223.
9. KAPPE, C.O. Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2008, **37**, 1127.
10. LANGA, F., P. DE LA CRUZ, A. DE LA HOZ, A. DIAZ-ORTIZ, E. DIEZ-BARRA. Microwave irradiation: more than just a method for accelerating reactions. *Contemp. Org. Synth.* 1997, **4**, 373-386.
11. DE LA HOZ, A., A. DIAZ-ORTIZ, A. MORENO. Microwaves in organic synthesis. Thermal, and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.* 2005, **24**, 164-178.
12. NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M., A. E. KÜMMERLE, E. J. BARREIRO, C. A. M. FRAGA. MAOS and Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. *Molecules*. 2011, **16**(11), 9274-9297.
13. Which microwave synthesis reactor is the best one for your research? *Anton-paar.com* [online]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/which-microwave-synthesis-reactor-is-the-best-one-for-your-research/>
14. SANTAGADA, V., F. FRECENTESE, E. PERISSUTTI, F. FIORINO, B. SEVERINO a G. CALIENDO. Microwave Assisted Synthesis: A New Technology in Drug Discovery. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2009, **9**(3), 340-358.
15. ROY, V., U. PRADÈRE a L. A. AGROFOGLIO. Microwave-assisted syntheses of nucleosides and their precursors. *Future Med. Chem.* 2010, **2**(2), 177-192.

16. MANGASULI, S. N., K. M. HOSAMANI a B. P. MANAGUTTI. Microwave assisted synthesis of coumarin-purine derivatives: An approach to in vitro anti-oxidant, DNA cleavage, crystal structure, DFT studies and Hirshfeld surface analysis. *Heliyon*. 2019, **5**(1). DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01131. ISSN 24058440.
17. MANGASULI, S. N., K. M. HOSAMANI, H. C. DEVARAJEGOWDA, M. M. KURJOGI a S. D. JOSHI. Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and anti-microbial agents. *Eur. J. Med. Chem.* [online]. 2018, **146**, 747-756. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.01.025. ISSN 02235234.
18. LANVER, A. a H.-G. SCHMALZ. Microwave-Assisted Amination of a Chloropurine Derivative in the Synthesis of Acyclic Nucleoside Analogues. *Molecules*. 2005, **10**(2), 508-515. DOI: 10.3390/10020508. ISSN 1420-3049.
19. MEIJERE, A. de a François DIEDERICH. Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. 2nd, completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004, ISBN 35-273-0518-1.
20. PLIETKER, B. Iron Catalysis in Organic Chemistry: Reactions and Applications. 1st, completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. ISBN 978-3527319275.
21. MATHEW, S. C., Y. BY, A. BERTHAULT, et al. Expeditious synthesis and biological evaluation of new C-6 1,2,3-triazole adenosine derivatives A1 receptor antagonists or agonists. *Org. Biomol. Chem.* 2010, **8**(17). DOI: 10.1039/c0ob00017e. ISSN 1477-0520.
22. SHYAMLAL, B. R., M. MATHUR, D. K. YADAV a S. CHAUDHARY. Microwave-assisted modified synthesis of C8-analogues of naturally occurring methylxanthines: Synthesis, biological evaluation and their practical applications. *Fitoterapia*. 2020. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104533. ISSN 0367326X.
23. QU, G., Z. ZHANG, H. GUO, M. GENG a R. XIA. Microwave-assisted rapid and regioselective synthesis of N-(alkoxycarbonylmethyl) nucleobases in water. *J. Braz. Chem. Soc.* [online]. 2007, **18**(5), 1061-1067. DOI: 10.1590/S0103-50532007000500028. ISSN 0103-5053.
24. KHALAFI-NEZHAD, A., A. ZARE, A. PARHAMI, M. N. S. RAD a G. R. NEJABAT. Microwave-assisted N-nitroarylation of some pyrimidine and purine nucleobases. *Can. J. Chem.* 2006, **84**(7), 979-985. DOI: 10.1139/v06-119. ISSN 0008-4042.
25. FISCHER, E. Ueber die beiden Methyltrichlorpurine. *Ber. Chem.* 1897, **30**(2), 1846-1859. DOI:10.1002/cber.189703002134. ISSN 03659496.
26. ORAZIO, A a S DOMENICO. Targets in heterocyclic systems. Chemistry and properties. *Roy. Soc. Chem.* 2008. ISBN 978-8886208512.
27. BECKER, Frank, Krishna MURTHI, Chase SMITH, et al. *A Three-Hybrid Approach to Scanning the Proteome for Targets of Small Molecule Kinase Inhibitors*. *Chem. Biol.* [online]. 2004, **11**(2). DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.02.001. ISSN 10745521.

28. PARKER, William a Mary LONG. Purine Metabolism in Mycobacterium tuberculosis as a Target for Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* [online]. 2007, **13**(6), 599-608. DOI: 10.2174/138161207780162863. ISSN 13816128.
29. BALDWIN, Stephen, Glenn MCCONKEY, Carol CASS a James YOUNG. Nucleoside Transport as a Potential Target for Chemotherapy in Malaria. *Curr. Pharm. Des.* [online]. 2007, **13**(6), 569-580. DOI: 10.2174/138161207780162845. ISSN 13816128.
MEHELLOU, Youcef a Erik DE CLERCQ. Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go? *J. Med. Chem.* [online]. 2010, **53**(2), 521-538. DOI: 10.1021/jm900492g. ISSN 0022-2623.
30. DE CLERCQ, Erik. Antiretroviral drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.* [online]. 2010, **10**(5), 507-515 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/j.coph.2010.04.011. ISSN 14714892.
31. Cancer. *World Health Organization* [online]. 2018. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
32. BOSCH, L., E. Harber, Ch. Heidelberger. *Cancer Res.* 1985, **8**, 335-343.
33. KUHN, John G. Fluorouracil and the New Oral Fluorinated Pyrimidines. *Annals of Pharmacotherapy* [online]. 2016, **35**(2), 217-227. DOI: 10.1345/aph.10096. ISSN 1060-0280.
34. TUNCBILEK, M, A. KUCUKDUMLU, E. B. GUVEN, D. ALTIPARMAK a R. CETIN-ATALAY. Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β -d-ribofuranosyl)purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* [online]. 2018, **28**(3), 235-239. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.12.070. ISSN 0960894X.
35. TAZAWA, H., T. KAWAGUCHI, T. KOBAYASHI, et al. Chronic inflammation-derived nitric oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* [online]. 2013, **319**(18), 2835-2844. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.08.006. ISSN 00144827.
36. LU, X., L. MIN, J. WEI, et al. Heliangin inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation through signaling NF- κ B pathway on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Biomed. Pharmacother.* [online]. 2017, **88**, 102-108. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.041. ISSN 07533322.
37. YOU, R., W. LONG, Z. LAI, et al. Discovery of a Potential Anti-Inflammatory Agent: 3-Oxo-29-noroleana-1,9(11),12-trien-2,20-dicarbonitrile. *J. Med. Chem.* [online]. 2013, **56**(5), 1984-1995. DOI: 10.1021/jm301652t. ISSN 0022-2623.
38. TRÁVNÍČEK, Z., P. ŠTARHA, J. VANČO, T. ŠILHA, J. HOŠEK, P. SUCHÝ a G. PRAŽANOVÁ. Anti-inflammatory Active Gold(I) Complexes Involving 6-Substituted-Purine Derivatives. *J. Med. Chem.* [online]. 2012, **55**(10), 4568-4579. DOI: 10.1021/jm201416p. ISSN 0022-2623.
39. WANG, X., Ch. HAN, K. WU, L. LUO, Y. WANG, X. DU, Q. HE a F. YE. Design, synthesis and ability of non-gold complexed substituted purine derivatives to inhibit LPS-induced inflammatory response. *Eur. J. Med. Chem.* [online]. 2018, **149**, 10-21. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.018. ISSN 02235234.

40. REICHENBACH, L. F., A. A. SOBRI, N. R. ZACCAI, et al. Structural Basis of the Mispairing of an Artificially Expanded Genetic Information System. *Chem* [online]. 2016, **1**(6), 946-958. DOI: 10.1016/j.chempr.2016.11.009. ISSN 24519294.
41. BUCHANAN, H. S., S. M. PAUFF, T. D. KOSMIDIS, et al. Modular, Step-Efficient Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Strategy To Access C6-Heteroaryl 2-Aminopurine Ribonucleosides. *Org. Lett.* [online]. 2017, **19**(14), 3759-3762. DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01602. ISSN 1523-7060.
42. PERIN, G., E. J. LENARDÃO, R. G. JACOB a R. B. PANATIERI. Synthesis of Vinyl Selenides. *Chemical Reviews* [online]. 2009, **109**(3), 1277-1301. DOI: 10.1021/cr8004394. ISSN 0009-2665.
43. DUARTE, L. F. B., R. L. OLIVEIRA, K. C. RODRIGUES, et al. Organoselenium compounds from purines: Synthesis of 6-arylselanylpurines with antioxidant and anticholinesterase activities and memory improvement effect. *Bioorg. Med. Chem.* [online]. 2017, **25**(24), 6718-6723. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.11.019. ISSN 09680896.
44. BALTIMORE, D. Expression of animal virus genome. *Bacteriol. Rev.* 1971, **35**, 235-241.
45. TURNER, M. A., X. YANG, D. YIN, K. KUCZERA, R. T. BORCHARDT a P. L. HOWELL. Structure and Function of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Cell Biochem. Biophys.* [online]. 2000, **33**(2), 101-125. DOI: 10.1385/CBB:33:2:101. ISSN 1085-9195.
46. SHIN, Y. S., D. B. JARHAD, M. H. JANG, et al. Identification of 6'- β -fluoro-homoaristeromycin as a potent inhibitor of chikungunya virus replication. *Eur. J. Med. Chem.* [online]. 2020, **187**. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111956. ISSN 02235234.
47. Hepatitis C. *World Health Organization* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
48. COATS, S. J., Ethel C. GARNIER-AMBLARD, Franck AMBLARD, et al. Chutes and ladders in hepatitis C nucleoside drug development. *Antiviral Res.* [online]. 2014, **102**, 119-147. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.11.008. ISSN 01663542.
49. OVADIA, R, A KHALIL, H LI, et al. Synthesis and anti-HCV activity of β -d-2'-deoxy-2'- α -chloro-2'- β -fluoro and β -d-2'-deoxy-2'- α -bromo-2'- β -fluoro nucleosides and their phosphoramidate prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.* [online]. 2019, **27**(4), 664-676. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.01.005. ISSN 09680896.
50. STRNAD, M. The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* [online]. 1997, **101**(4), 674-688. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x. ISSN 0031-9317.
51. WERBROUCK, S. P. O., M. STRNAD, H. A. VAN ONCKELEN a P. C. DEBERGH. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol. Plant.* [online]. 1996, **98**(2), 291-297. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x. ISSN 00319317.
52. MATUŠKOVÁ, V., M. ZATLOUKAL, J. VOLLER, et al. New aromatic 6-substituted 2'-deoxy-9-(β)-d-ribofuranosylpurine derivatives as potential plant

- growth regulators. *Bioorg. Med. Chem.* [online]. 2020, **28**(2). DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115230. ISSN 09680896.
53. LU, W., S. SENGUPTA, J. L. PETERSEN, N. G. AKHMEDOV a X SHI. Mitsunobu Coupling of Nucleobases and Alcohols: An Efficient, Practical Synthesis for Novel Nonsugar Carbon Nucleosides. *J. Org. Chem.* [online]. 2007, **72**(13), 5012-5015. DOI: 10.1021/jo070515.
54. GERGELA, D. *Příprava 6,9-disubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 82 s. (89 679 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/24864>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav chemie. Vedoucí práce Rouchal, Michal.
55. TUNÇBILEK, M., Z. ATEŞ-ALAGÖZ, N. ALTANLAR, A. KARAYEL a S. ÖZBEY. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new substituted purine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* [online]. 2009, **17**(4), 1693-1700 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.12.050. ISSN 09680896.
56. ALLU, S. a K. C. KUMARA SWAMY. Ruthenium-Catalyzed Oxidative Annulation of 6-Anilinopurines with Alkynes via C-H Activation: Synthesis of Indole-Substituted Purines/Purine Nucleosides. *Wil. Lib.* [online]. 2015, **357**(12), 2665-2680 DOI: 10.1002/adsc.201500314. ISSN 16154150.
57. JORDA, R., N. SACERDOTI-SIERRA, J. VOLLER, et al. Anti-leishmanial activity of disubstituted purines and related pyrazolo[4,3-d]pyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* [online]. 2011, **21**(14), 4233-4237. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.05.076. ISSN 0960894X.
58. ZATLOUKAL, F. *Syntéza pyrrolo[2,3-d]pyrimidinů s adamantanovým skeletem*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 79 s. (94 919 znaků). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/40653>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav chemie. Vedoucí práce Rouchal, Michal.
59. TICHAVSKÁ, V. *Syntéza nových derivátů s pyrrolo[2,3-d]pyrimidinovým skeletem*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 70 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/42400>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav chemie. Vedoucí práce Rouchal, Michal.
60. VELECKÝ, R. *Syntéza 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-d]pyrimidinů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 46 s. (56 000). Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/42070>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Rouchal, Michal.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MW	mikrovlnné zahřívání
rt	pokožová teplota
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
TEMPO	(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
DTBP	di- <i>terc</i> -butyl peroxid
TBHP	<i>terc</i> -butyl hydroperoxid
DCP	dikumylperoxid
PNA	peptidové nukleové kyseliny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
TEA	triethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
RNA	ribonukleová kyselina
HIV	virus lidské imunodeficiencie
5-FU	5-fluoruracil
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
Huh7	rakovinné buňky jater
HCT116	rakovinné buňky tlustého střeva
MCF7	rakovinné buňky prsu
HCC	hepatocelulární karcinom
HepG2	rakovinné buňky jater
MAHLAVU	rakovinné buňky jater
FOCUS	rakovinné buňky jater
LD ₅₀	smrtná dávka inhibující 50 % testovaných jedinců
Au(L3)(PPh ₃)	zlatný komplex trifenyfosfinu
THP-1	buněčná linie akutní monocytární leukémie

PEG 400	polyethylenglykol 400
AChE	acetylcholinesteráza
NaBH ₄	tetrahydridoboritan sodný
ssRNA	jednovláknová RNA
SARS	jedna z forem koronaviru (z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome)
MERS	jedna z forem koronaviru (z angl. Middle East Respiratory Syndrome)
CHIKV	infekce způsobená Chikungunya virem
mRNA	mediátorová RNA
SAM	S-adenosinmethionin
SAH	S-adenosylhomocystein
EC ₅₀	účinná koncentrace
DAA	kyselina D-asparagová
GT	genotyp
HCV	hepatitida C
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
PPh ₃	trifenylfosfin
TBAF	tetra- <i>N</i> -butylamonium florid
BAP	6-benzylaminopurin
BOP	1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát
TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>t</i> _t	teplota tání

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Proces působení mikrovlnného záření v reakční nádobě. ⁷	11
Obrázek 2: Schéma distribuce mikrovln v monomódovém reaktoru. ¹³	12
Obrázek 3: Schéma distribuce mikrovln v multimódovém paralelním reaktoru. ¹³	13
Obrázek 4: Schéma distribuce mikrovln v multimódovém jednodávkovém reaktoru. ¹³	14
Obrázek 5: Schéma srovnání konvenční a mikrovlnné přípravy derivátů.....	15
Obrázek 6: Syntéza acyklovirových bioisosterů.....	16
Obrázek 7: Příklad mikrovlnami asistované 1,3-dipolární cykloadice.....	17
Obrázek 8: Schéma dvojnásobné cykloadice za užití 1,3-diazidopropanu.....	18
Obrázek 9: Schéma syntézy kofeinových derivátů.....	19
Obrázek 10: Schéma mikrovlnami asistované syntézy stavebních kamenů PNA.....	20
Obrázek 11: Příklad mikrovlnami asistované syntézy na pevném nosiči.....	21
Obrázek 12: Příklady léčiv proti hepatitidě typu B.	22
Obrázek 13: Příklady protinádorových léčiv.	23
Obrázek 14: Syntéza a biologická aktivita nové řady 6-substituovaných derivátů amino-9-(β-D-ribofuranosyl)purinu.....	24
Obrázek 15: Vzorec sloučeniny Au(L3)(PPh ₃).	25
Obrázek 16: Syntéza a biologická aktivita 6-substituovaných a 6,9-disubstituovaných purinů.....	26
Obrázek 17: Syntéza 6-arylselanylpurinů.....	28
Obrázek 18: Syntéza 6'-fluor-5'-homoaristeromycinových analogů.....	29
Obrázek 19: Schválená antivirotika Boceprevir, Telaprevir a Sofosbuvir.	30
Obrázek 20: Schéma přípravy purinových nukleosidových analogů.....	31
Obrázek 21: Vzorce příslušných izoprenoidních a aromatických cytokininů.....	32
Obrázek 22: Jednostupňová syntéza řady 6-substituovaných 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosyl purinů.....	33
Obrázek 23: 6,9-disubstituované puriny a 4,7-disubstituované pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidiny připravované v naší výzkumné skupině.....	45
Obrázek 24: Alkylace 6-chlor-9 <i>H</i> -purinu.....	45
Obrázek 25: ¹ H NMR spektrum sloučeniny 2	46
Obrázek 26: ¹ H NMR spektrum sloučeniny 3	47
Obrázek 27: Aminy použité pro nukleofilní aromatickou substituci atomu chloru na C6.	48
Obrázek 28: Vzorová reakce za použití triethylaminu.	48
Obrázek 29: Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce sloučeniny 2	49
Obrázek 30: ¹ H NMR spektrum sloučeniny 5	50
Obrázek 31: ESI-MS spektrum sloučeniny 6	52

Obrázek 32: Návrh fragmentace iontu $[M+H]^+$ sloučeniny 6	53
Obrázek 33: Mikrovlnami asistovaná nukleofilní aromatická substituce sloučeniny 3	54
Obrázek 34: ^1H NMR spektrum sloučeniny 13	55

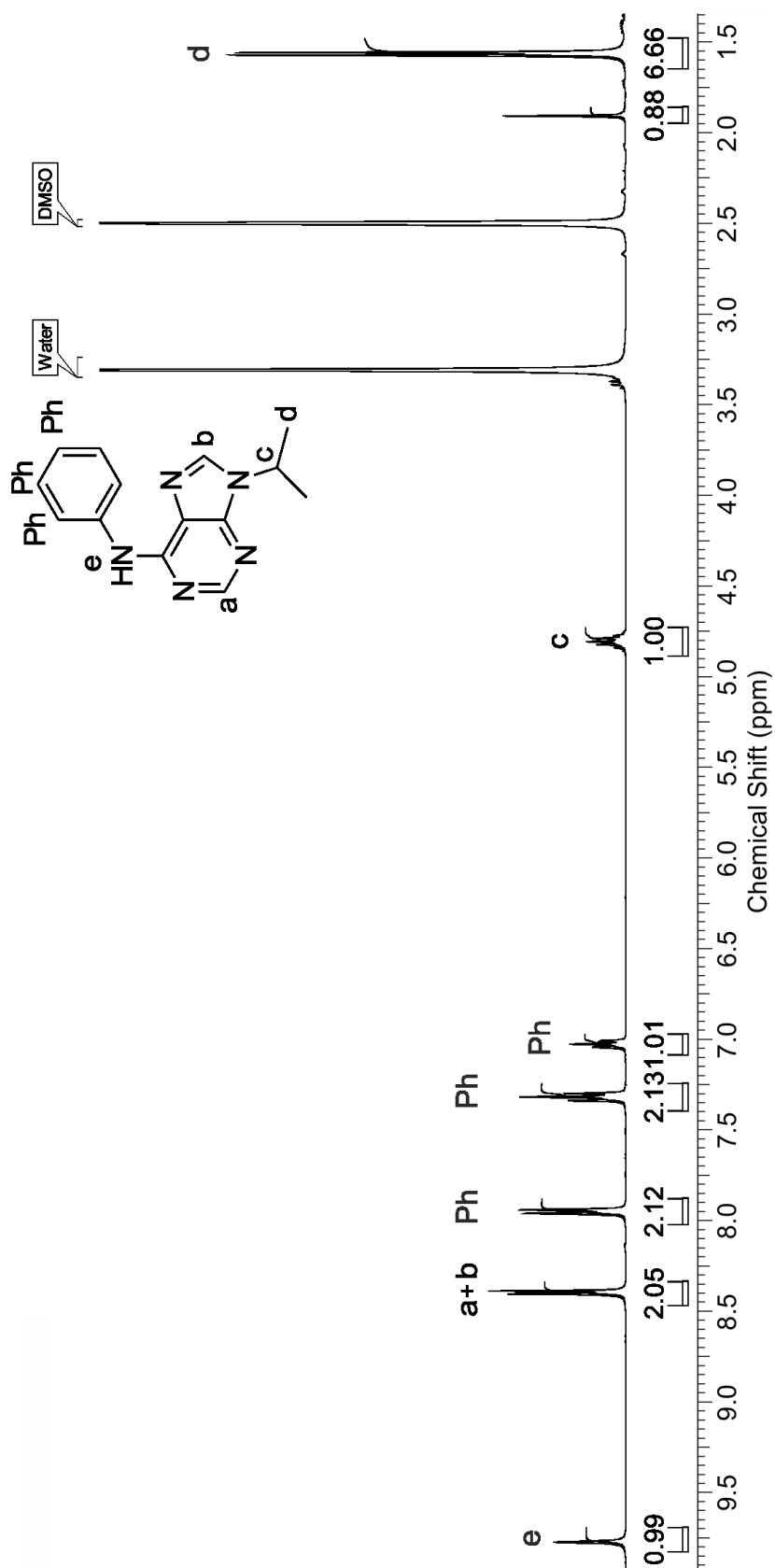
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání naměřených a teoretických hodnot nabitých iontů příslušných sloučenin 4–9.....	51
--	----

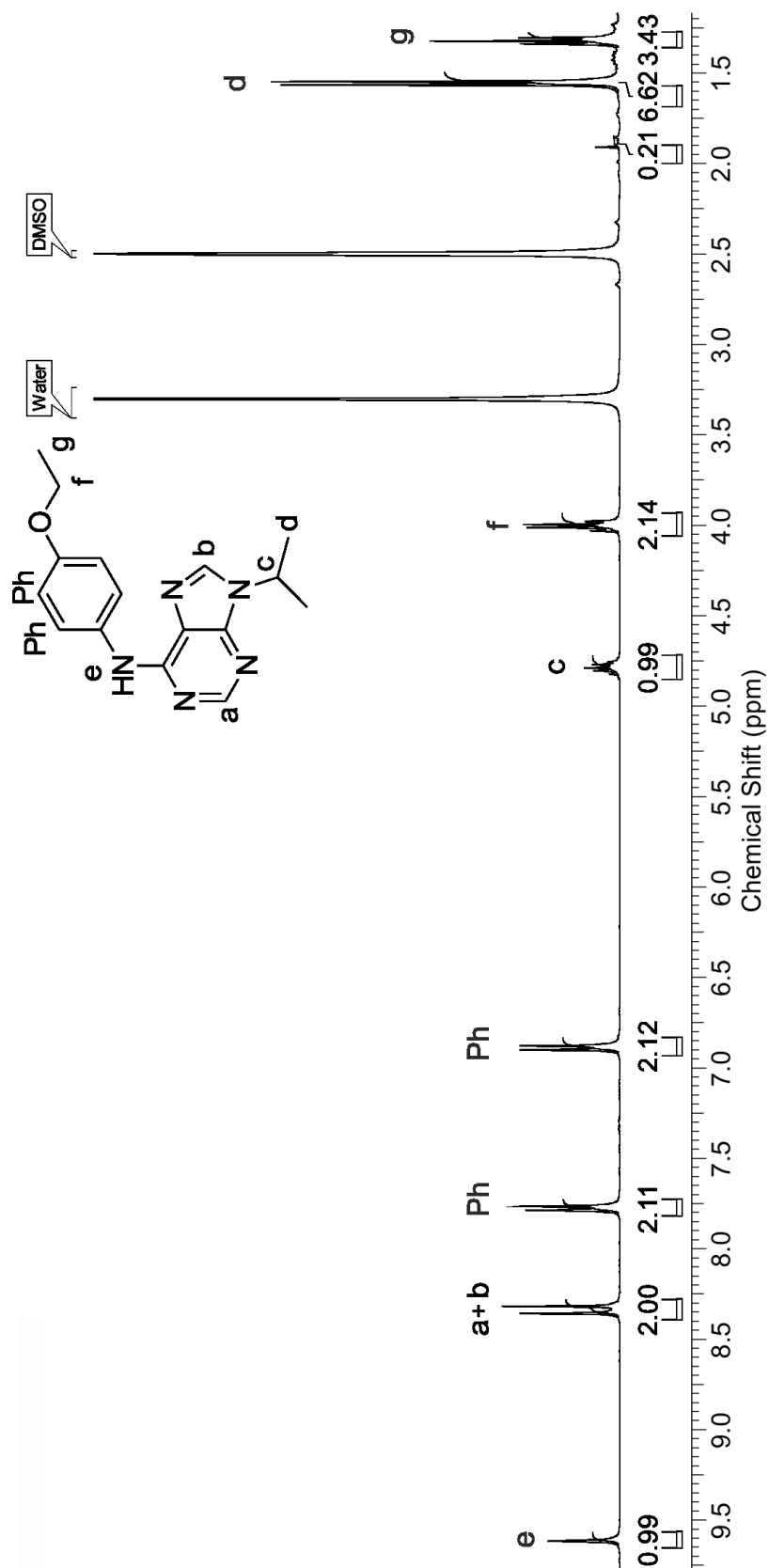
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: ^1H NMR spektrum *N*-feryl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (4)
- Příloha 2: ^1H NMR spektrum *N*-4-ethoxyferyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (6)
- Příloha 3: ^1H NMR spektrum *N*-4-chlorferyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (7)
- Příloha 4: ^1H NMR spektrum *N*-4-bromferyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (8)
- Příloha 5: ^1H NMR spektrum *N*-4-flourferyl-9-isopropyl-9*H*-purin-6-aminu (9)
- Příloha 6: ^1H NMR spektrum *N*-feryl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-aminu (10)
- Příloha 7: ^1H NMR spektrum *N*-4-methylferyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-aminu (11)
- Příloha 8: ^1H NMR spektrum *N*-4-ethoxyferyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-aminu (12)
- Příloha 9: ^1H NMR spektrum *N*-4-bromferyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-aminu (14)
- Příloha 10: ^1H NMR spektrum *N*-4-flourferyl-9-cyklopentyl-9*H*-purin-6-aminu (15)

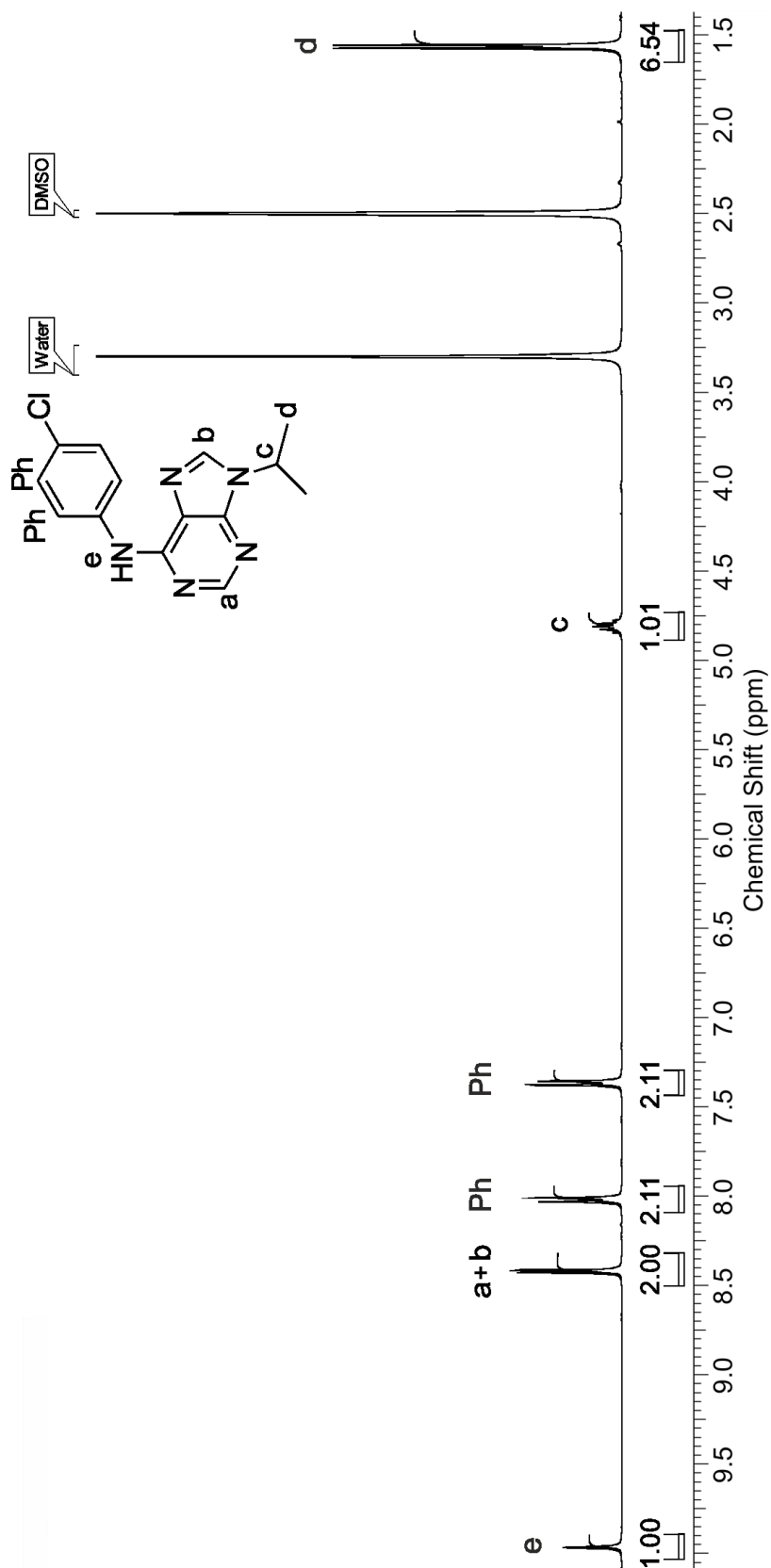
PŘÍLOHA 1: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-FENYL-9-ISOPROPYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (4)



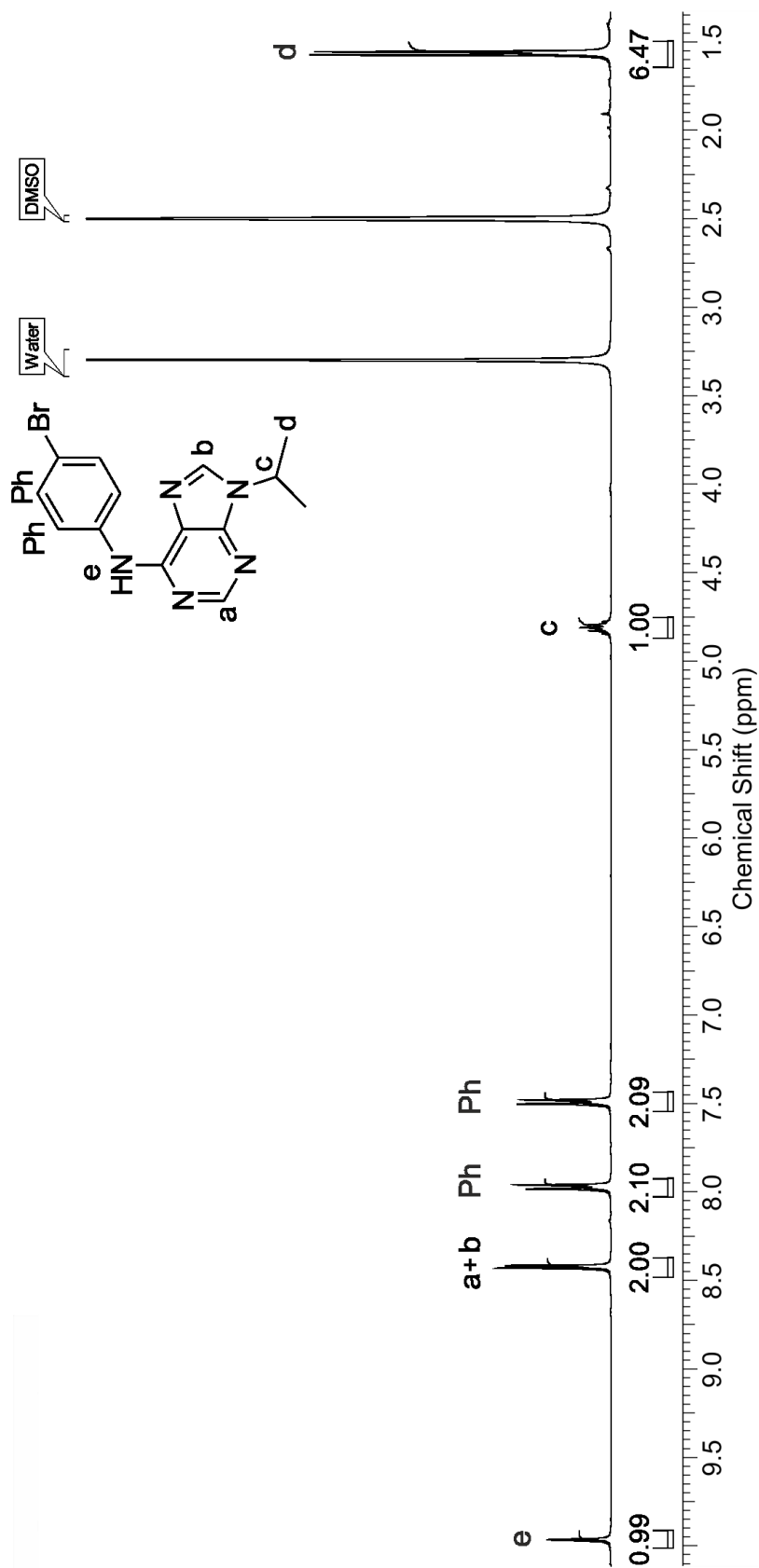
PŘÍLOHA 2: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-4-ETHOXYFENYL-9-ISOPROPYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (6)



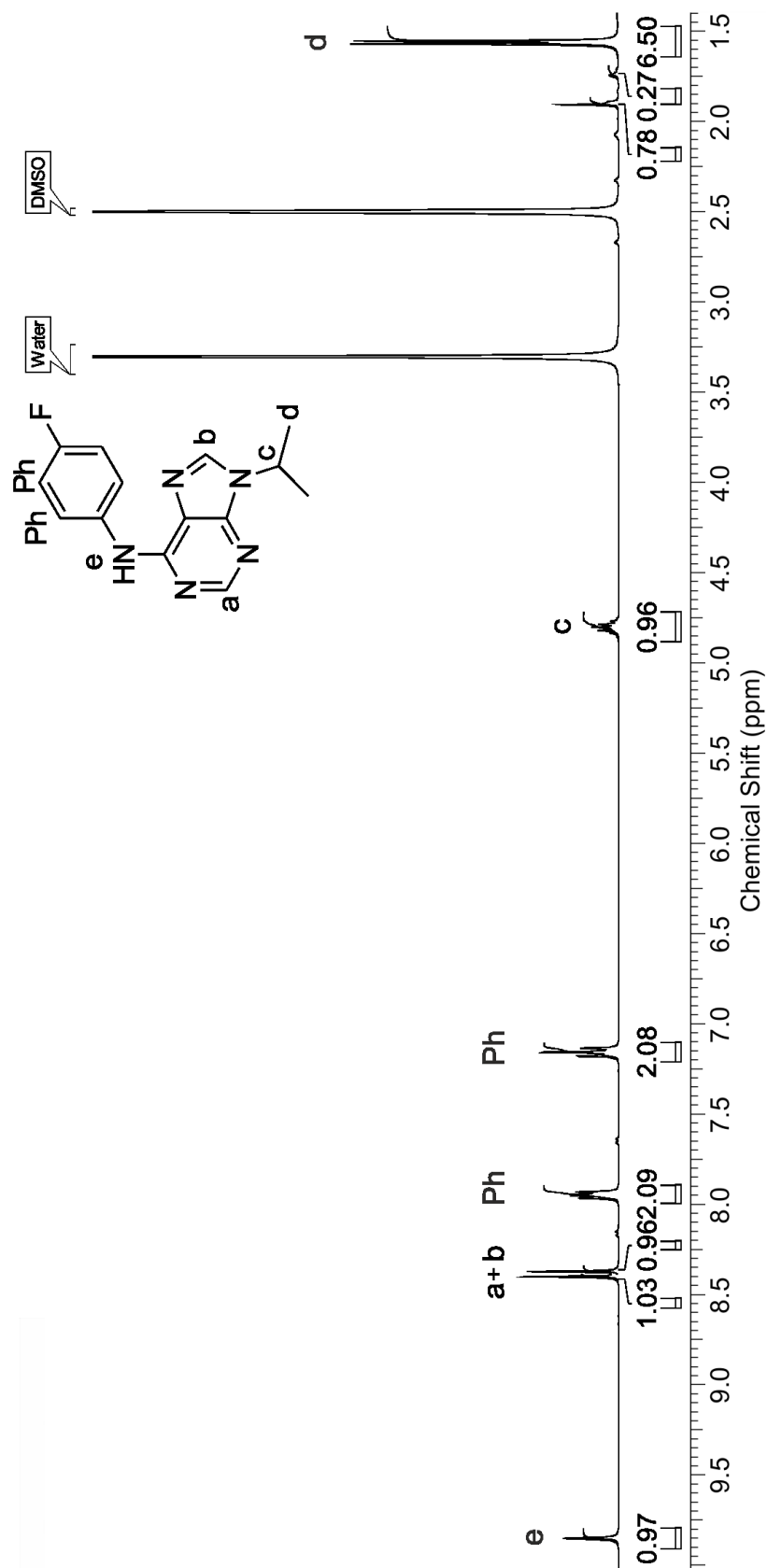
PŘÍLOHA 3: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-4-CHLORFENYL-9-ISOPROPYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (7)



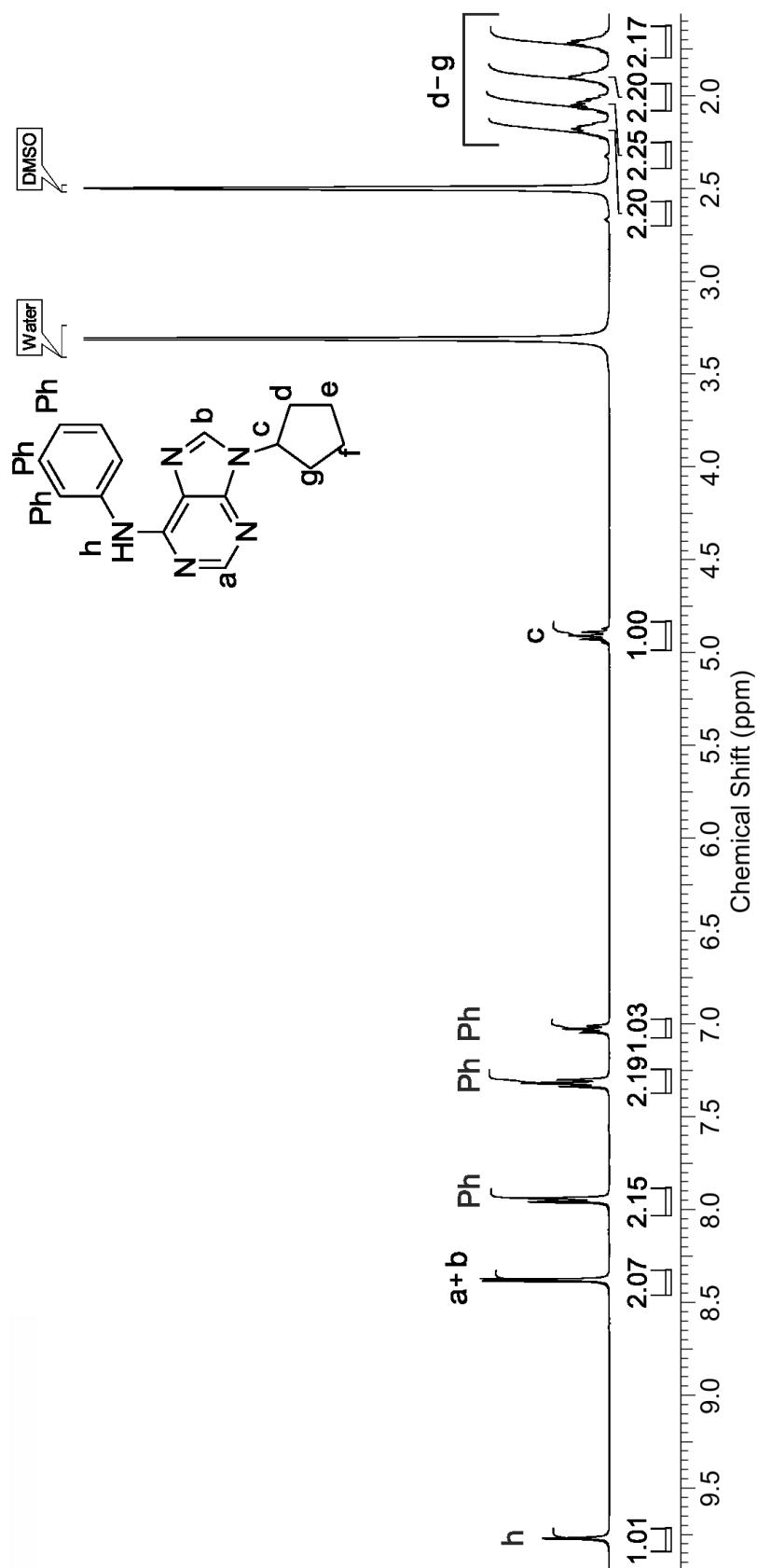
PŘÍLOHA 4: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-4-BROMFENYL-9-ISOPROPYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (8)



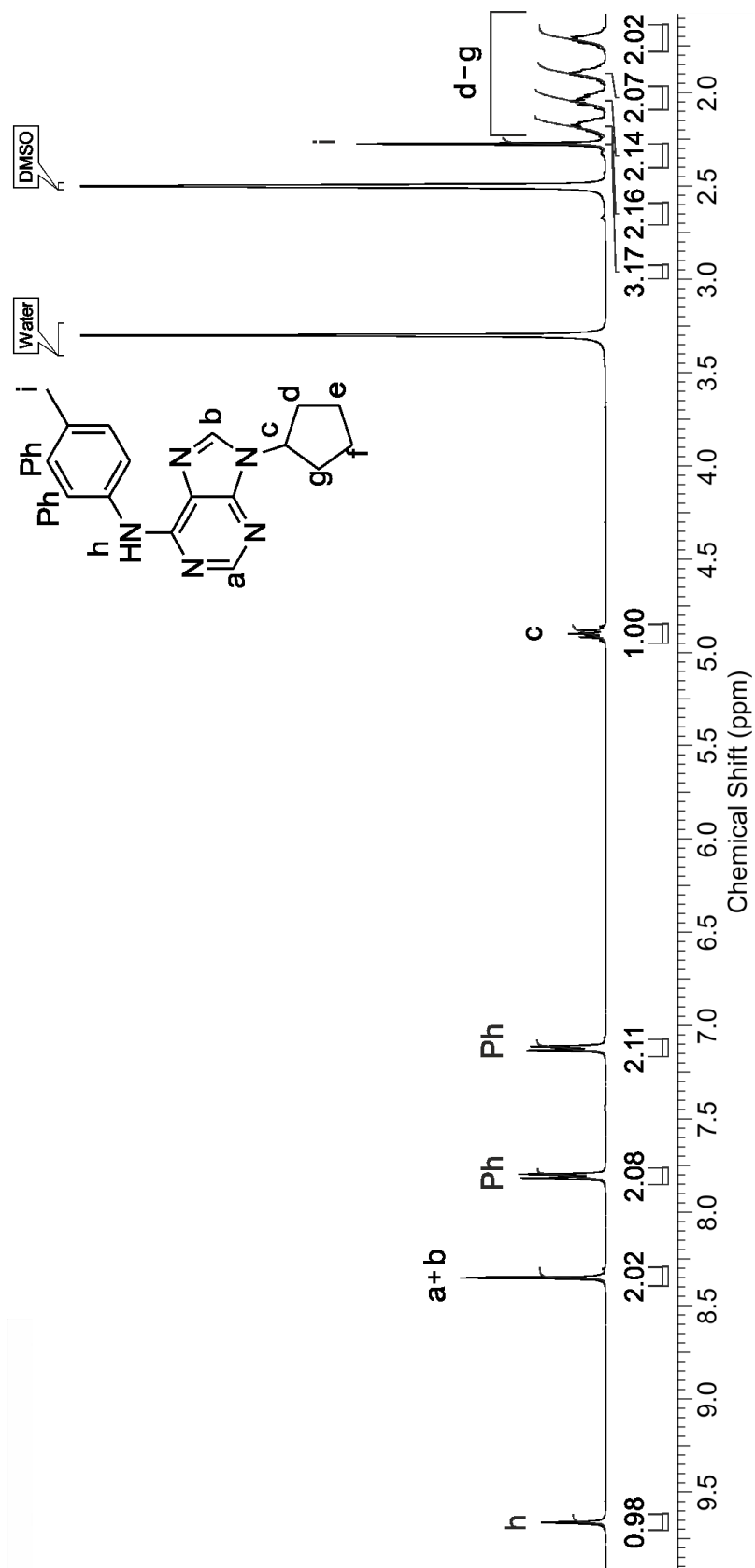
PŘÍLOHA 5: ^1H NMR SPEKTRUM *N*-4-FLUORFENYL-9-ISOPROPYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (9)



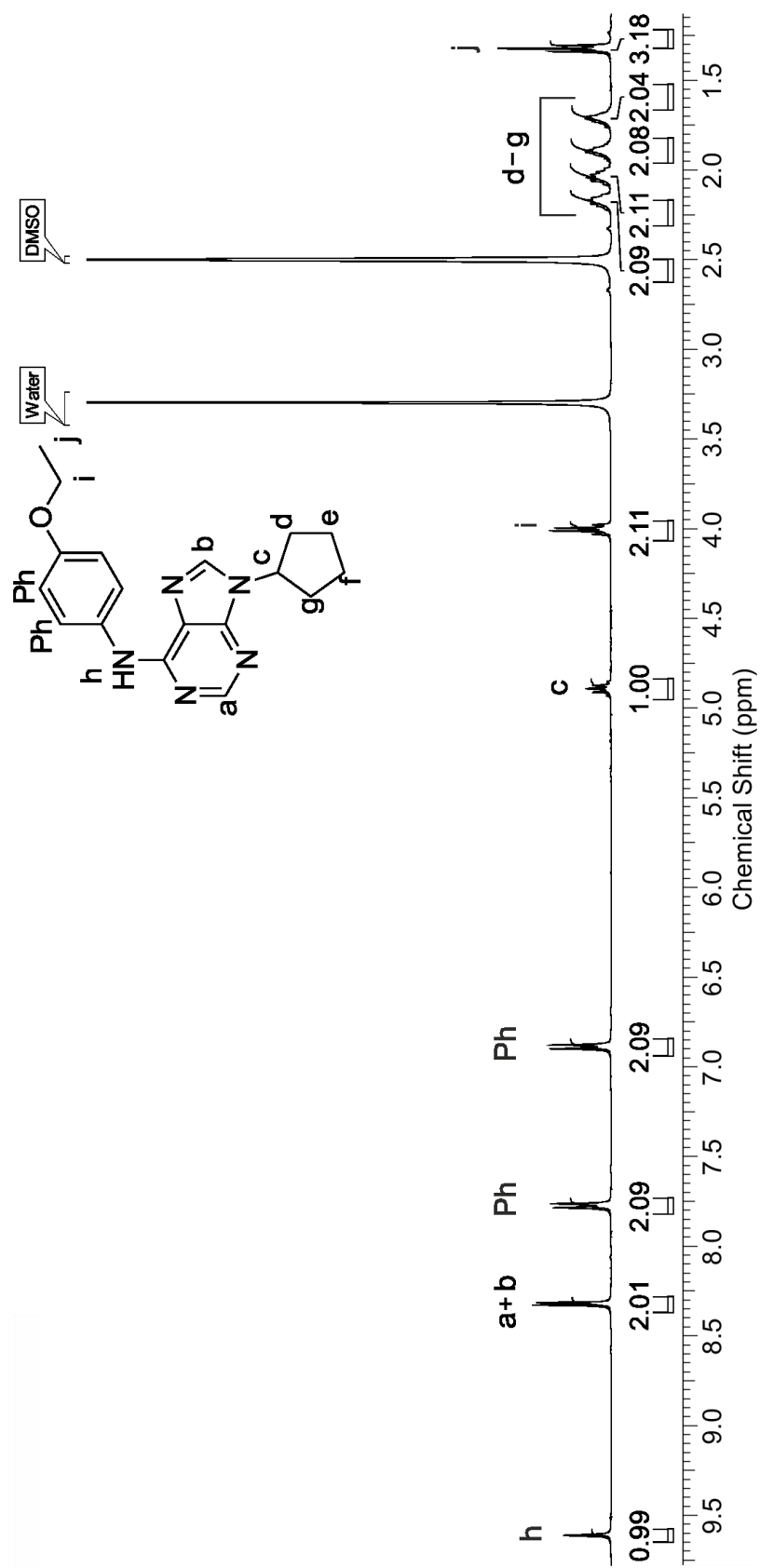
PŘÍLOHA 6: ^1H NMR SPEKTRUM *N*-FENYL-9-CYKLOPENTYL-9H-PURIN-6-AMINU (10)



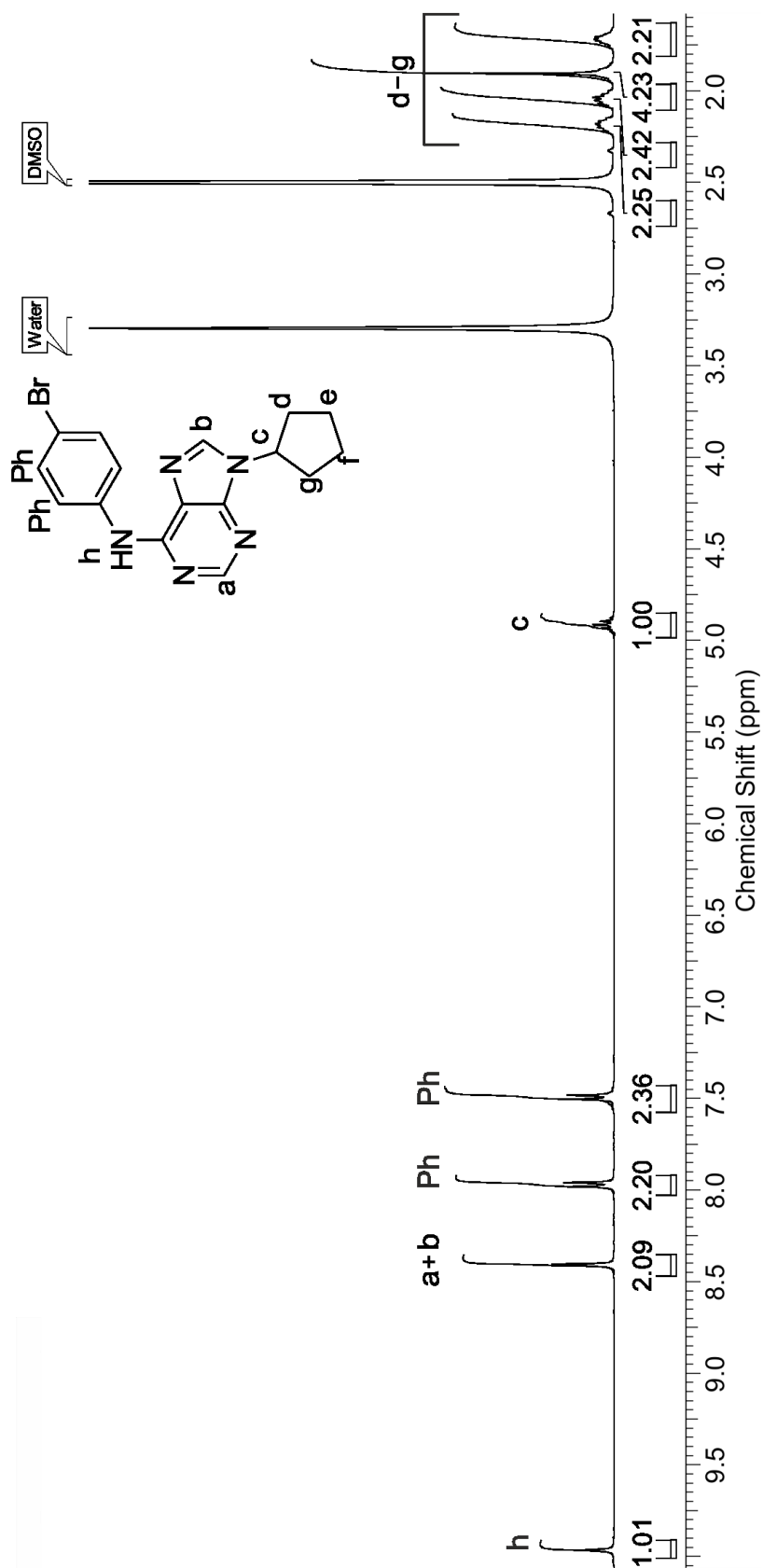
PŘÍLOHA 7: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-4-METHYLFENYL-9-CYKLOPENTYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (11)



PŘÍLOHA 8: ¹H NMR SPEKTRUM *N*-4-ETHOXYFENYL-9-CYKLOPENTYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (12)



PŘÍLOHA 9: ^1H NMR SPEKTRUM *N*-4-BROMFENYL-9-CYKLOPENTYL-9*H*-PURIN-6-AMINU (14)



PŘÍLOHA 10: ¹H NMR SPEKTRUM N-4-FLUORFENYL-9-CYKLOPENTYL-9H-PURIN-6-AMINU (15)

