

Studium syntézy adamantanem substituovaných purinových ribonukleosidů

Bc. Vladimír Kroupa

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vladimír Kroupa**

Osobní číslo: **T14497**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium syntézy adamantanem substituovaných purinových ribonukleosidů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část:

1. Stručně pojednat o možnostech syntézy purinových ribonukleosidů.
2. Zpracovat literární rešerši na téma biologické účinky purinových ribonukleosidů.

II. Praktická část:

1. Připravit vybrané aromatické aminy s adamantanovým skeletem.
2. Provést sérii experimentů vedoucích k syntéze 2,6-disubstituovaných a 2,6,9-trisubstituovaných purinových ribonukleosidů obsahujících v poloze 6 adamantanový skelet.
3. Všechny syntetizované látky charakterizovat pomocí metod strukturní analýzy.
4. Po úspěšném provedení úkolů definovaných v bodech 1-3 otestovat finální látky na vybraných buněčných cílech.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HOLÝ, A.: Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik. PpF UP v Olomouci, 2004, 414 s. ISBN: 80-244-0855-4

[2] Dle provedení literární rešerše pomocí databází SciFinder a Reaxys

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

Datum zadání diplomové práce: **15. ledna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2016**

Ve Zlíně dne 15. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Stanislav Kafka, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výtěžku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byla syntéza nových purinových ribonukleosidů nesoucích nepolární aromatické aminy s adamantanovým skeletem v poloze 6 purinového kruhu. Potřebné aromatické aminy byly připraveny několika krokovou syntézou zahrnující nitraci, sulfurizaci, redukci nitro skupiny na primární amino skupinu a Mozingovu redukci. V další části práce byla provedena série experimentů s cílem připravit novou sérii purinových ribonukleosidů, přičemž bylo využito mechanismů nukleofilní aromatické substituce a chráněné glykosylace a deprotektce. Všechny připravené sloučeniny byly plně charakterizovány pomocí metod strukturní analýzy (IR, NMR, MS).

Klíčová slova: ribonukleosidy, adamantan, puriny, biologická aktivita

ABSTRACT

The aim of this thesis was to synthesize new purine ribonucleosides bearing nonpolar aromatic adamantane substituent in position 6 of the purine ring. Aromatic amines were prepared using multi step procedure containing consecutive aromatic nitration, sulphurisation, reduction of nitro group to primary amine and Mozingo's reduction. In the next part of this thesis, a series of experiments with the aim to prepared new family of purine ribonucleosides, were performed. Mechanisms of nucleophilic aromatic substitution and protected glycosylation followed by deprotection of the ribose ring were used during these experiments. All prepared compounds were fully characterized using spectral methods (IR, NMR, MS).

Keywords: ribonucleosides, adamantane, purines, biological activity

Zde bych chtěl poděkovat mému vedoucímu Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. nejen za odborné vedení, ale i za čas při konzultacích a předání velmi cenných zkušeností při mém studiu organické syntézy.

Dále děkuji Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za praktické rady a měření NMR spekter.

Z celého srdce bych chtěl poděkovat Ing. Janě Hermanové za neutuchající trpělivost, za čas, který mi věnovala při konzultacích a za mnoho praktických zkušeností a rad, které vedly k úspěšnému vypracování mé diplomové práce.

Děkuji také kolektivu laboratoře 409 za skvělé pracovní prostředí plné tolerance a humoru.

Závěrem bych chtěl poděkovat celé mé rodině za podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia a s ním spojených aktivit.

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

Ve Zlíně 9.5.2016

.....

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA PURINŮ A RIBONUKLEOSIDŮ	12
1.1 PURINOVÉ SLOUČENINY.....	12
1.1.1 Mechanismus detoxikace dusíkatých látek z těla.....	14
1.2 RIBONUKLEOSIDY.....	15
2 MOŽNOSTI PŘÍPRAVY PURINŮ A PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ	16
2.1 METODY SYNTÉZY PURINOVÉHO KRUHU	16
2.2 METODY SYNTÉZY PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ.....	17
2.2.1 Ribosylace	19
2.2.2 Deprotekce	22
2.3 NUKLEOFILNÍ AROMATICKÉ SUBSTITUCE DO POLOHY 6 PURINOVÉHO KRUHU	23
2.3.1 „Klasické“ metody nukleofilní substituce s tvorbou vazby C–N.....	23
2.3.2 Palladiem katalyzované substituce podporující vznik vazby C–C.....	24
2.4 NOVÉ POZNATKY VE VÝZKUMU BIOLOGICKY AKTIVNÍCH PURINOVÝCH LÁTEK A RIBONUKLEOSIDŮ	25
2.4.1 Antituberkulotika	25
2.4.2 Inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	26
2.4.3 Cytostatika.....	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
3 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	30
4 SYNTÉZA 1-ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ	32
4.1 NITRACE ADAMANTYL(FENYL)METHANONU.....	32
4.2 REAKCE 1-ADAMANTYL(NITROFENYL)KETONŮ S ETHAN-1,2-DITHIOLEM	33
4.3 REDUKCE NITRODITHIOLANŮ NA AMINODITHIOLANY	34
4.4 DESULFURIZACE AMINODITHIOLANŮ	35
5 SYNTÉZA PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ.....	37
5.1 CHLORACE HYPOXANTHINU	37
5.2 RIBOSYLACE 6-CHLOR-9H-PURINU.....	38
5.3 NUKLEOFILNÍ SUBSTITUCE ATOMU CHLORU SLOUČENINY 16.....	39
5.3.1 Reakce sloučeniny 16 s anilinem	39
5.4 NUKLEOFILNÍ SUBSTITUCE 6-CHLOR-9H-PURINU.....	40
5.4.1 Reakce sloučeniny 14 s anilinem	40

5.5	RIBOSYLACE <i>N</i> -FENYL-9 <i>H</i> -PURIN-6-AMINU	41
5.6	DEPROTEKCE SLOUČENINY 18	42
6	SYNTEZA NOVÝCH 6-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ PURINU.....	43
6.1	REAKCE 6-CHLOR-9 <i>H</i> -PURINU S AROMATICKÝMI ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝMI AMINY	43
6.1.1	Reakce s 3-(1-adamantylmethyl)anilinem.....	43
6.1.2	Reakce s 4-(1-adamantylmethyl)anilinem.....	43
6.2	REAKCE 2,6-DICHLOR-9 <i>H</i> -PURINU S AROMATICKÝMI ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝMI AMINY	44
6.2.1	Reakce s 3-(1-adamantylmethyl)anilinem.....	44
6.2.2	Reakce s 4-(1-adamantylmethyl)anilinem.....	45
III	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7	PŘÍPRAVA 1-ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ	47
7.1	NITRACE ADAMANTYL(FENYL)METHANONU.....	47
7.2	REAKCE NITROKETONŮ S ETHAN-1,2-DITHIOLEM	48
7.3	REDUKCE NITRODITHIOLANŮ NA AMINODITHIOLANY	48
7.4	MOZINGOVA REDUKCE	49
8	PŘÍPRAVA MODELOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ	53
8.1	PŘÍPRAVA 6-CHLOR-9 <i>H</i> -PURINU.....	53
8.2	SYNTECKÁ CESTA I.....	54
8.2.1	Ribosylace 6-chlor-9 <i>H</i> -purinu.....	54
8.2.2	Reakce sloučeniny 16 s anilinem	56
8.2.3	Deprotekce sloučeniny 18	58
8.3	SYNTECKÁ CESTA II.....	60
8.3.1	Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru	60
8.3.2	Ribosylace <i>N</i> -fenyl-9 <i>H</i> -purin-6-aminu	60
9	PŘÍPRAVA NOVÝCH DERIVÁTŮ PURINU.....	62
9.1	REAKCE 6-CHLOR-9 <i>H</i> -PURINU S NEPOLÁRNÍMI AMINY	62
9.2	REAKCE 2,6-DICHLOR-9 <i>H</i> -PURINU S NEPOLÁRNÍMI AMINY	64
9.3	RIBOSYLACE SLOUČENINY 22.....	66
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	77

ÚVOD

Purinové nukleosidy představují skupinu látek, která umožňuje mnoho úprav spolu s velkým počtem kombinací substituentů, jak na purinovém kruhu, tak i na cukerné části. Lze tak připravit velké množství látek s různou škálou biologických vlastností, kde některé mohou sloužit k léčbě nemocí a zlepšování životních podmínek pacientů.

To, že se purin v přírodě v čisté formě nevyskytuje, neznamená, že není pro člověka důležitou molekulou. Je základním stavebním kamenem nukleových kyselin – deoxyribonukleové kyseliny a ribonukleové kyseliny. Konkrétně se jedná o molekuly adeninu a guaninu, a právě úpravou těchto sloučenin (pomocí chemických syntéz) mohou vznikat zajímavé deriváty s velkou variabilitou biologických vlastností. Jako příklad lze uvést inhibici enzymů nebo antibakteriální či antivirotické účinky. Purinový skelet je také základem pestrého spektra léčiv od antivirotik až po léky proti nádorovým onemocněním.

Purinové ribonukleosidy se skládají z purinového skeletu, na jehož atomu dusíku N9 je N9-glykosidickou vazbou přes anomerní atom uhlíku C1 ribózy vázána ribofuranózová jednotka. Tato vazba je hemiacetalového typu a je relativně chemicky labilní. Heterocyklická báze může kolem této vazby omezeně rotovat za změny konformace molekuly. Ribózová jednotka je také schopna kolem této vazby omezeně rotovat a zaujímat různé, pro pětičlenné kruhy obvyklé, konformace, tzv. „ring puckering“ neboli deformace kruhu. Hlavními zástupci této důležité skupiny látek jsou adenosin a guanosin, ze kterých vznikají fosforylací hydroxylové skupiny na atomu uhlíku C2, C3 nebo C5 ribózy nukleotidy adenosintrifosfát a guanosintrifosfát.¹

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA PURINŮ A RIBONUKLEOSIDŮ

Purinové sloučeniny jsou významnou skupinou látek, ze kterých jsou sestaveny nukleosidy, alkaloidy, inhibitory enzymů nebo různá léčiva.

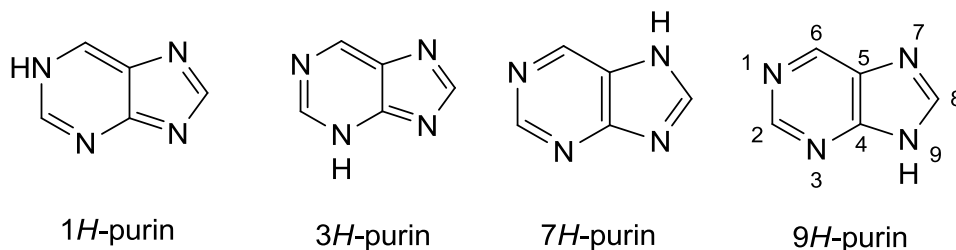
Ribonukleosidy jsou složeny z purinového kruhu a ribózy navázané v poloze N9. K nejdůležitějším purinovým ribonukleosidům patří adenosin a guanosin, ale významné jsou i jejich četné deriváty.

1.1 Purinové sloučeniny

Purin je heterocyklická, aromatická, organická sloučenina, která je základem životně důležitých molekul.

Purin byl poprvé popsán Hermannem Emilem Fischerem v roce 1884, kdy tento německý vědec dokázal, že je purin základním stavebním kamenem pro velmi důležité sloučeniny v lidském těle i mimo něj. Při jeho práci se mu podařilo necíleně syntetizovat neznámější deriváty purinu jako například adenin, guanin, xanthin nebo kyselinu močovou. Byl také první, komu se povedlo synteticky připravit kofein.²

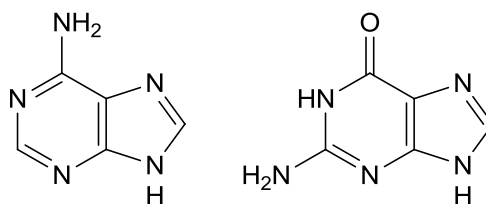
Molekula purinu (**Obrázek 1**) byla poprvé syntetizována v roce 1898. Tím, kdo ji připravil, nebyl nikdo jiný, než výše zmíněný německý vědec. O pouhé čtyři roky později mu byla udělena Nobelova cena za chemii za studium syntézy purinu a cukrů.³



Obrázek 1: Čtyři existující tautomery purinového kruhu.

V přírodě se purin v čisté formě nevyskytuje, ale tvoří mnoho derivátů. Zde je třeba zmínit adenin a guanin (**Obrázek 2**), což jsou sloučeniny, které s deriváty pyrimidinu – thyminem a cytosinem, tvoří dvoušroubovici DNA, resp. jednovláknovou RNA s uracilem. Watson a Crick objevili v roce 1953 způsob, jakým se báze párují. Podstatou tohoto mechanismu je vytvoření vodíkových vazeb mezi atomy vodíku, dusíku a kyslíku

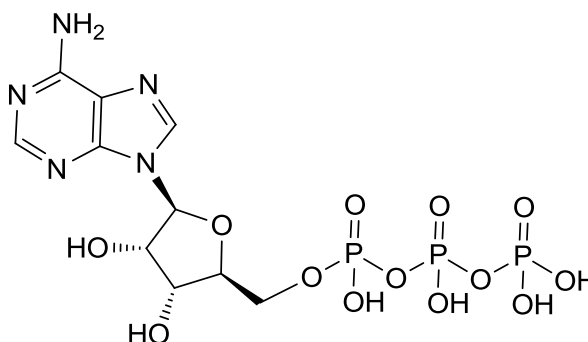
a vytvoření dvoušroubovice neboli α -helixu. Jedná se tak bezpochyby o nejdůležitější deriváty purinu.



Obrázek 2: Strukturní vzorce adeninu (vlevo) a guaninu (vpravo).

Purinový skelet je součástí řady důležitých biomolekul. Jako příklad lze uvést:

- adenosintrifosfát (ATP, **Obrázek 3**) – makroergická sloučenina, která odštěpením fosfátové skupiny uvolňuje velké množství energie potřebné pro chod endergonických procesů;
- nikotinamidadeninukleotid (NADH) – důležitá součást dýchacího řetězce, zajišťuje přenos vodíku při syntéze výše uvedeného ATP;
- koenzym A – plní funkci kofaktoru při oxidaci (odbourávání) mastných kyselin, účastní se oxidace pyruvátu v citrátovém cyklu, je prostetickou skupinou při přenosu proteinů a v některých enzymatických reakcích plní roli substrátu.



Obrázek 3: Strukturní vzorec ATP.

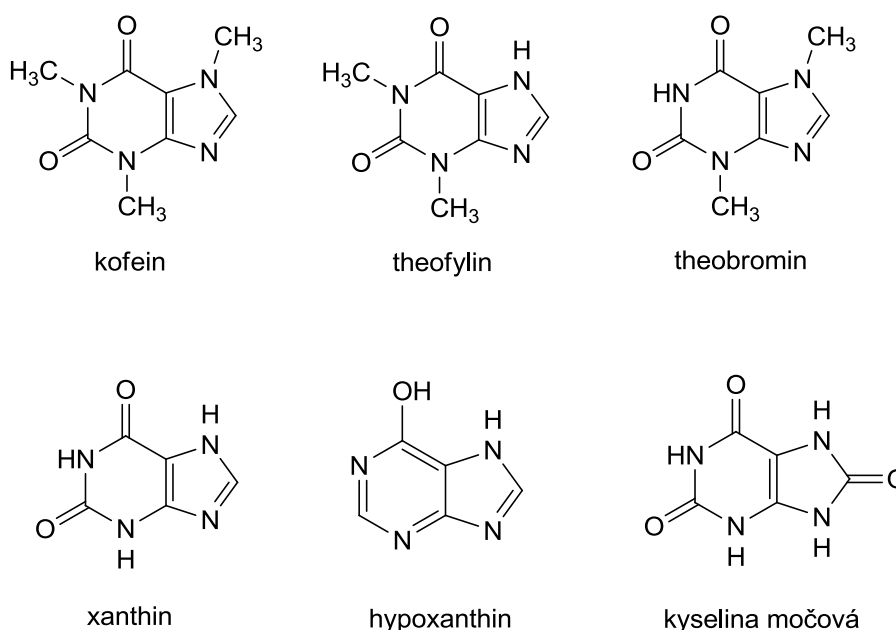
Jelikož jsou purinové molekuly esenciální, tak u lidí a obratlovců došlo k vytvoření komplexního systému syntézy purinových nukleosidů pro jejich metabolismus, při němž využívají dostupné materiály, a sice glukózu, glutamin a glycin. Dalším způsobem získávání purinových nukleosidů je recyklace těch, které prochází tělem a velký vliv hraje také strava, ze které se doplňují chybějící nukleosidy. Puriny se nacházejí ve vysoké koncentraci v mase a masných výrobcích, zejména ve vnitřních orgánech, jako jsou játra a ledviny. Strava založená na rostlinách zajišťuje obecně nízký příjem purinových látek,

avšak některé rostliny jich obsahují významné množství. Jsou jimi obzvláště suché fazole, špenát a houby.⁴

Dalšími významnými sloučeninami s purinovým skeletem jsou (**Obrázek 4**):

- kofein – hlavní xanthinový alkaloid, stimuluje centrální nervovou soustavu a dočasně odvrací únavu;
- theobromin – je obsažen v čokoládě, má podobné vlastnosti jako kofein a theofylin, je toxický pro psy;
- theofylin – způsobuje bronchodilataci (rozšíření průdušek), dříve léčivo proti astma;
- xanthin – vyskytuje se v lidském těle jako meziproduct při degradaci purinů;
- hypoxanthin – substrát pro některé bakterie a viry, součást nukleosidu inosinu, který podporuje růst svalů;
- kyselina močová – konečný produkt ornithinového (močovinnového) cyklu u lidí.

Strukturální vzorce výše komentovaných sloučenin jsou uvedeny na **Obrázku 4**.



Obrázek 4: Vybrané deriváty purinu.

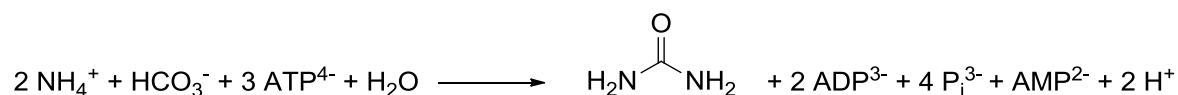
1.1.1 Mechanismus detoxikace dusíkatých látek z těla

Amoniak je bez ohledu na cestu vzniku pro buňku toxický. V těle se nachází ve dvou formách, a sice jako NH₃ a NH₄⁺, kde vzájemný poměr závisí na pH. Při fyzických

hodnotách je z 99 % disociován. Hlavní cestou detoxikace amoniaku je ureosyntetický cyklus.⁵

Ureosyntetický systém začíná v mitochondriích sloučením karbamoylfosfátu s ornithinem za vzniku citrulinu, který následně opouští mitochondrii a v cytosolu se váže na aspartát, čímž vzniká arginosukcinát. Při tomto kroku se spotřebovává ATP. Rozštěpením arginosukcinátu vzniká fumarát a arginin. Fumarát je využit v citrátovém cyklu a arginin je hydrolytickým enzymem arginázou hydrolyzován na ornithin (vrací se do mitochondrie) a močovinu, která glomerulární filtrací přechází do moči.⁵ Na schématu zobrazeném níže je popsána rovnice vzniku močoviny.

Schéma 1



1.2 Ribonukleosidy

V ribonukleosidech je purinová nebo pyrimidinová báze vázána na atomu uhlíku C1 ribózy.⁶ Nukleosidová vazba v pyrimidinových ribonukleosidech je stabilnější než v ribonukleosidech purinových. I tak lze strukturu purinových ribonukleosidů upravovat přidáním variabilních substituentů. Základní purinové nukleosidy jsou adenosin a guanosin, které obsahují purinový kruh spojený β -N9-glykosidovou vazbou s ribózou.⁷

Adenosin je v přírodě se vyskytující nukleosid, který je přítomen v lidském těle jako meziprodukt tělesných biosyntéz. Kromě své metabolické funkce v buňkách, je adenosin uvolňován neurony (buňky nervového systému) a astrocyty (pomocné buňky nervového systému) do extracelulárního prostoru. Zde potom mění citlivost receptorů na postsynaptické membráně synapsí na neuromediátory. Následkem toho jsou vzruchy zesilovány nebo zeslabovány.⁸

Ribonukleosidy jsou základní stavební jednotkou nukleotidů, ze kterých je sestavena ribonukleová a deoxyribonukleová kyselina. Nukleotidy vznikají navázáním esteru fosforečné kyseliny na hydroxylovou skupinu cukerné složky nukleosidu.⁷

2 MOŽNOSTI PŘÍPRAVY PURINŮ A PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ

2.1 Metody syntézy purinového kruhu

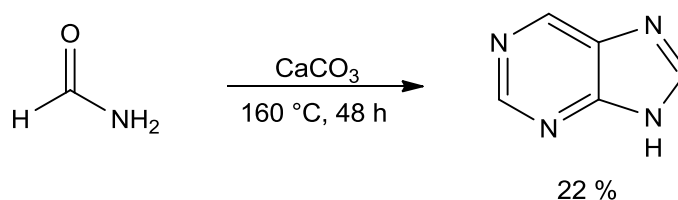
Na **Schématu 2** je znázorněna průmyslová syntéza purinu vycházející z formamidu. Reakce probíhá při teplotě 160 °C po dobu 48 hodin v přítomnosti katalyzátoru. Katalyzátorem mohou být porézní sorbenty typu uhličitanů, zeolitů, kaolínu, silikátu a aluminy. Každý katalyzátor poskytuje při syntéze purinu jiné výtěžky a některé (**Tabulka 1**) vedou ke vzniku směsi různých purinových látek (adenin nebo cytosin).

Tabulka 1: Vybrané katalyzátory a následné produkty kondenzace formamidu.

	Katalyzátor	Produkt/y	Výtěžek (%)
1	---	9H-purin	3
2	CaCO ₃	9H-purin	22
3	kaolín	adenin, cytosin, 9H-purin	5; <1; <1
4	zeolit	adenin, cytosin, 9H-purin	8; <1; <1
5	alumina	adenin, cytosin, 9H-purin	4; <1; <1
6	křemičitan	adenin, cytosin, 9H-purin	<1; <1; <1

Na uvedeném schématu je jako katalyzátor použit CaCO₃, přičemž dochází ke vzniku pouze požadovaného produktu ve výtěžku 22 %, což je ve srovnání s ostatními používanými katalyzátory výtěžek nejvyšší, přesto nelze tuto hodnotu považovat za uspokojivou.⁹

Schéma 2



2,6-Dichlorpurin je důležitým meziproductem ve farmaceutickém průmyslu. Je ve velkém měřítku používán k syntézám purinových nukleosidů a nukleotidů. Existují dva způsoby vedoucí k syntéze 2,6-dichlorpurinu.¹⁰

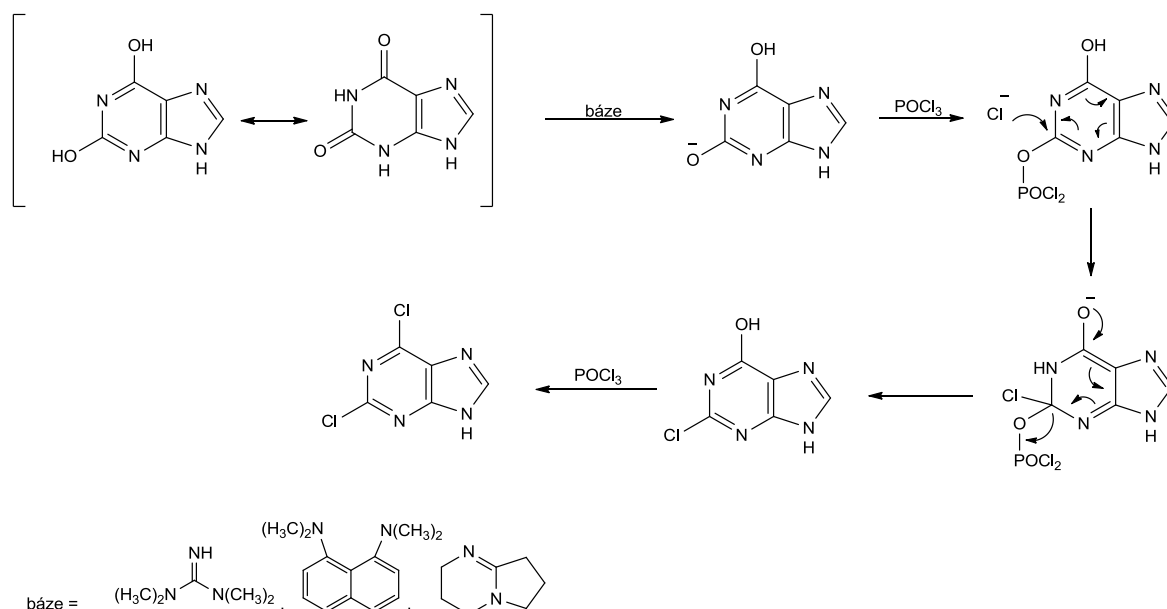
Prvním je chlorace purinového kruhu, např. xanthinu (3,7-dihydropurin-2,6-dion) pomocí chloridu pyrofosforylu v utěsněné trubici při vysokých teplotách nebo chlorací

6-chlorpurinu, hypoxanthinu nebo jejich derivátů chloridem fosforily za refluxu v přítomnosti katalyzátoru fázového přenosu. Za snížené teploty lze využít chlorace 2,6-dithiopurinu plynným chlórem.¹¹

Druhou cestu představuje výstavba purinového kruhu deriváty barbiturové kyseliny nebo použití 2,4-dichlor-5,6-diaminopyridinu jako základního stavebního materiálu. Ani jedna z těchto cest se průmyslově nevyužívá, a sice kvůli nízkým výtěžkům, dlouhé reakční době a komplikované purifikaci.¹²

Nejvíce využívanou je průmyslová výroba 2,6-dichlorpurinu chlorací xanthinu s využitím chloridu fosforily jako chloračního činidla (**Schéma 3**).¹¹

Schéma 3



2.2 Metody syntézy purinových ribonukleosidů

Je všeobecně známo, že sacharidy a glykokonjugáty hrají důležitou roli v různých biologických procesech, včetně virových a bakteriálních infekcí, buněčném růstu a proliferaci, v mezibuněčné komunikaci i imunitě. Je velmi obtížné získat dostatek strukturálně dobře definovaných sacharidů a glykokonjugátů, které se vyskytují v přírodě v nízkých koncentracích.¹²

Proto syntézy nukleosidů neprobíhají podle univerzálního klíče. Tudíž je každá syntéza svým způsobem unikátní a vyžaduje speciální požadavky na podmínky, činidla a katalyzátory.

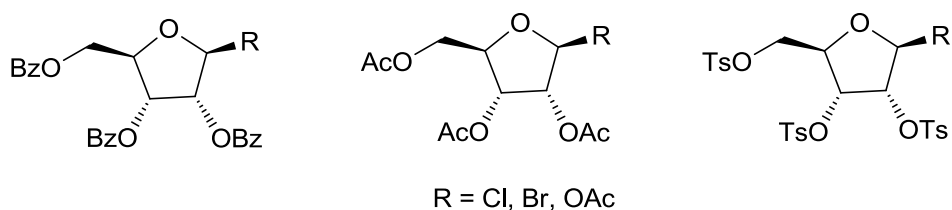
Sacharidy obsahují velký počet funkčních skupin a musí být rozlišeny tak, aby bylo dosaženo požadované chemoselektivity a regioselektivity.

Glykosylové donory a akceptory lze spojit přes α -glykosidovou nebo β -glykosidovou vazbu. Vznikají anomerní směsi, které nemohou být použity pro testování biologicky aktivních látek. Problém nastává u samotné syntézy i u konečné purifikace.¹³

Stereoselektivní tvorba glykosylové vazby je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou odstupující skupiny, rozpouštědla, aktivační systémy, podmínky reakce, ale co je nejdůležitější – chránící skupiny donoru a akceptoru. Obvykle se chránící skupina zavádí do molekuly dočasně, jako náhrada funkční skupiny, jejíž stabilita se neslučuje s podmínkami reakce, působením dalších činidel nebo chemickým prostředím. Druh chránících skupin určuje druh funkčních skupin. Chránící skupiny mohou během glykosylačních reakcí zvýšit nebo snížit reaktivitu komponent nebo určovat stereochemii výsledných sloučenin po glykosylaci.¹³

Skupina 2-*O*-acylová se obvykle volí při reakcích, jejichž produktem mají být 1,2-*trans*-glykosidy, zatímco 2-*O*-etherové chránící skupiny se používají při syntéze 1,2-*cis*-glykosidů. Reakce mohou vést ke vzniku glykosidů se špatnou anomerní selektivitou.¹³

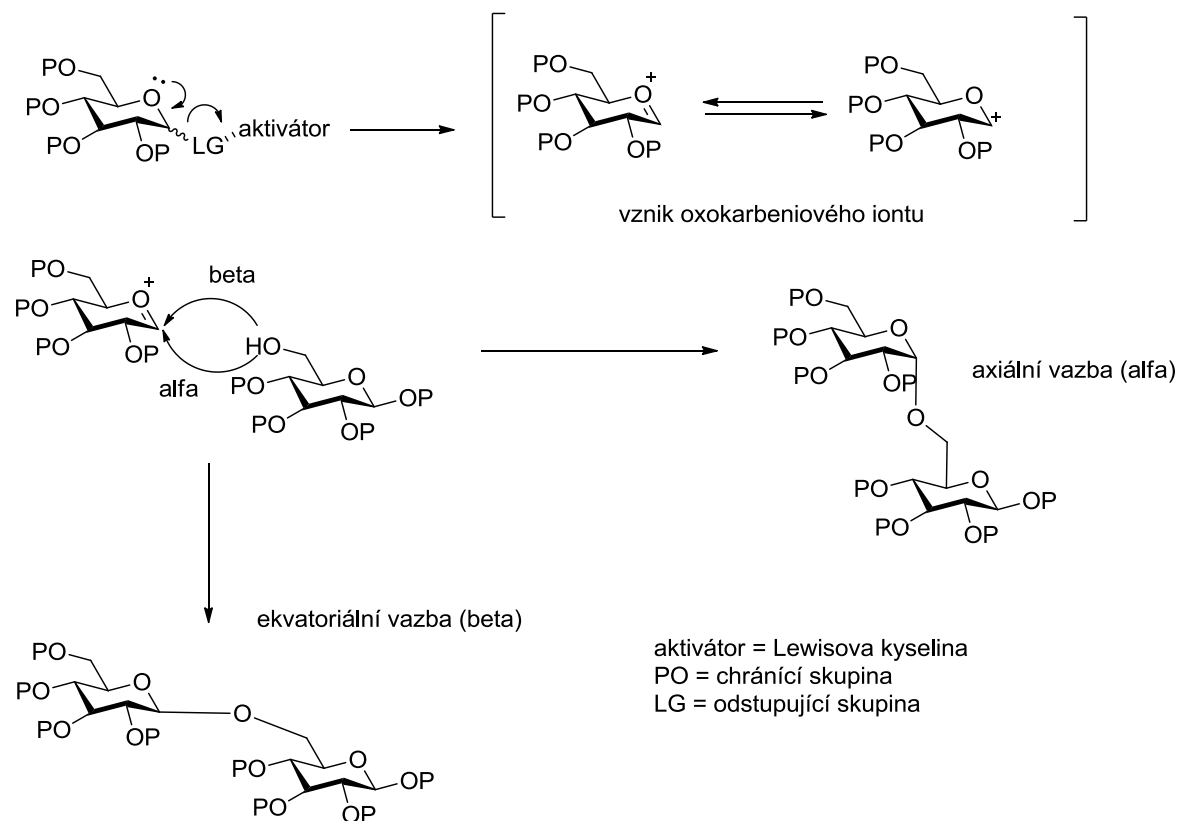
Při syntéze ribonukleosidů je cukerná složka reprezentována ribózou, jejíž hydroxylové skupiny mohou být chráněny např. benzoylovými, acylovými, tosylovými nebo halogenovými skupinami. Příklady běžně používaných typů chráněné ribózy jsou uvedeny na **Obrázku 5**.



Obrázek 5: Nejběžněji používané druhy chráněné ribózy.

Je důležité, aby v poloze C2 ribózy byl reaktivní substituent, který reakcí s kyselým atomem vodíku v poloze N9 purinového kruhu umožňuje vznik karbokationtu. Tento kladně nabitý karbokation umožňuje přístup aniontu záporně nabitě purinové báze. Tímto způsobem vzniká výhradně β -anomer (diriguje sacharid do prostoru před rovinu purinového skeletu).¹³ Na **Schématu 4** je uveden obecný postup glykosylace.¹⁴

Schéma 4



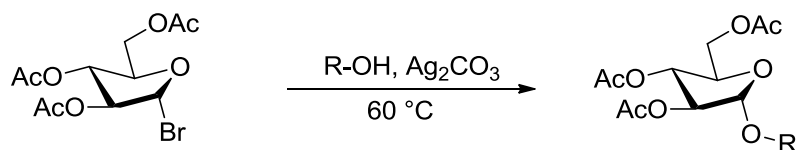
Cukerné složky nukleosidů jsou neustále zkoumány pro velké množství možných úprav pomocí různorodých substituentů za vzniku látek, které mají významné biologické vlastnosti.⁷

2.2.1 Ribosylace

Metoda podle Koenigse a Knorra

Koenigsova-Knorrova metoda zahrnuje substituční reakci, do které vstupuje halogenid glykosylu s alkoholem za vzniku glykosidu. Představuje jednu z nejstarších a nejjednodušších glykosylačních reakcí. Na **Schématu 5** je znázorněna Koenigsova-Knorrova reakce peracetylované 3-bromribózy.¹⁵

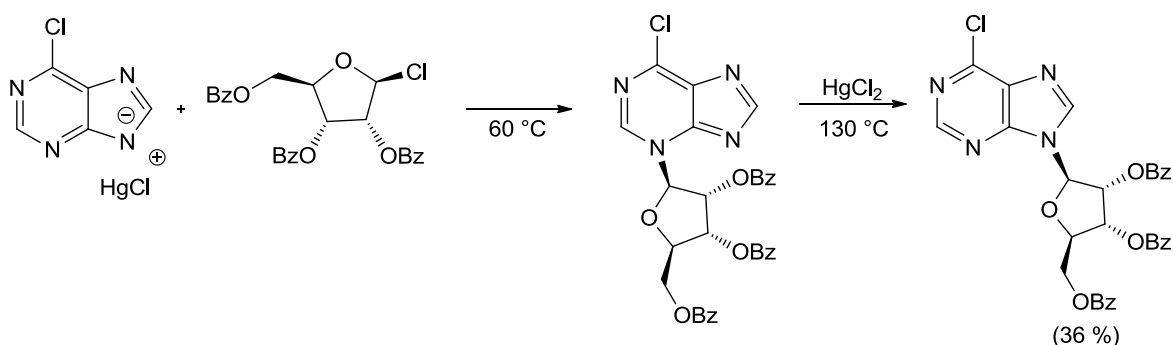
Schéma 5



V reakci zobrazené na **Schématu 6** reaguje rtuťnatá sůl 6-chlorpurinu a chráněná ribóza. Benzoylovaná ribóza se při teplotě 60 °C váže do polohy N3 purinového kruhu ve výtěžku 36 %.¹⁶ Za katalýzy chloridem rtuťnatým při 130 °C dochází k přesmyku benzoylované ribózy do polohy N9 purinového skeletu ($\approx 36\%$).¹⁷

Namísto rtuťnatých solí se mohou použít soli stříbrné ve formě oxidů, uhličitanů nebo chloristanů.¹⁶ Tato varianta se ovšem používá jen v minimální míře, a to z důvodu nízké rozpustnosti a vyšší polaritě stříbrných solí.¹⁸

Schéma 6

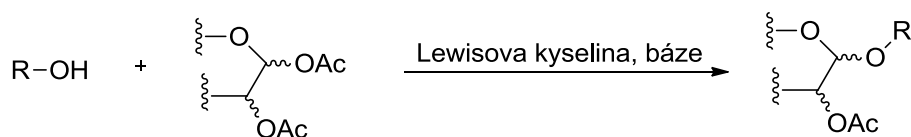


Využití této metody je ve skutečnosti minimální. Důvodem jsou malé výtěžky a zbytek rtuti v reakční směsi, která může ovlivnit výsledky testů na biologickou aktivitu.¹⁸

Metoda podle Helfericha a Schmitz-Hillebrechta

Všeobecným principem této metody je reakce alkoholu s chráněným sacharidem v přítomnosti organické báze a činidla s charakterem Lewisovy kyseliny. Součástí reakce je i deprotektce chránících skupin prováděná nejčastěji methanolátem sodným v prostředí methanolu. Výše popsaná reakce je znázorněna na **Schématu 7**.¹⁶

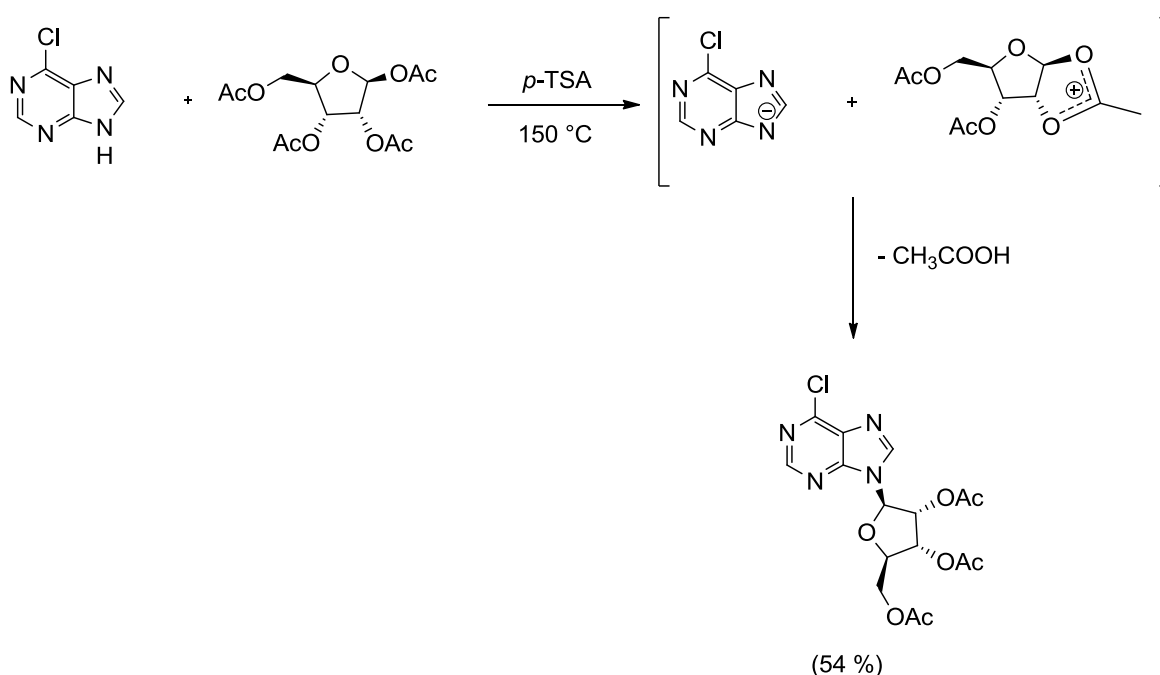
Schéma 7



Na **Schématu 8** je popsána reakce 6-chlor-9*H*-purinu s plně acetylovanou ribózou při 150 °C v přítomnosti *p*-toluensulfonové kyseliny (*p*-TSA). Vznikající meziprodukty spolu reagují za vzniku požadované sloučeniny ve výtěžku 54 %.

Nutno podotknout, že při této reakci nedochází k anomerizaci na atomu uhlíku C2 ribózy. Naopak použitím ZnCl₂, prodloužením reakční doby a zvýšením teploty reakce končí změnou (inverzí) konfigurace. U této metody je výhodou možnost využití plně acetylované ribózy.¹⁶

Schéma 8

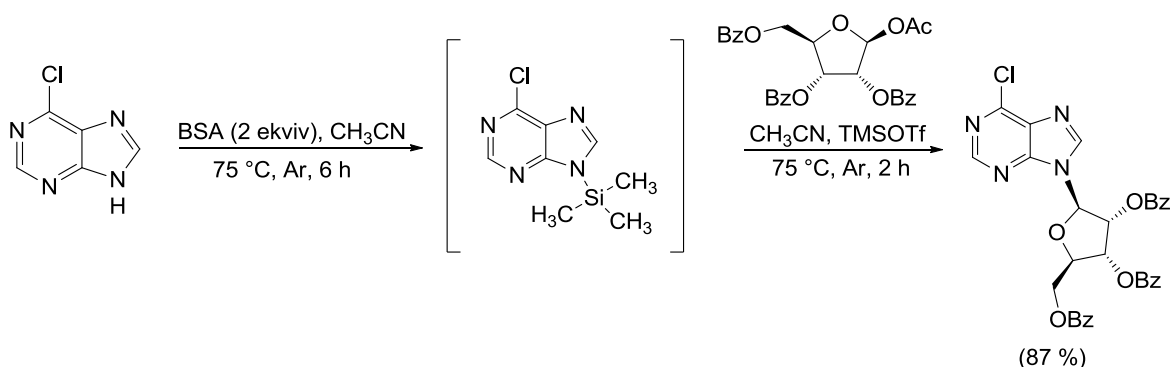


Metoda podle Vorbrüggena

Tato metoda popisuje reakce silylovaných heterocyklických bází s peracetylovanými cukry v přítomnosti Lewisovy kyseliny. Získávají se přírodní β-nukleosidy.¹⁹ Výhodou je, že po přidání vody do reakční směsi se silylační činidlo ihned rozpadá.⁷

Na **Schématu 9** je znázorněna syntéza, v níž nejprve 6-chlor-9*H*-purin reaguje s přebytkem bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA), čímž dochází k aktivaci polohy N9 purinového kruhu. Ve druhém kroku se přidá chráněná ribóza a trimethylsilyl trifluormethansulfonát (TMSOTf). Reakce je ukončena přidáním vody.²⁰ V porovnání s reakcí na **Schématu 6** (36 %), jsou výtěžky znatelně vyšší (87 %).

Schéma 9

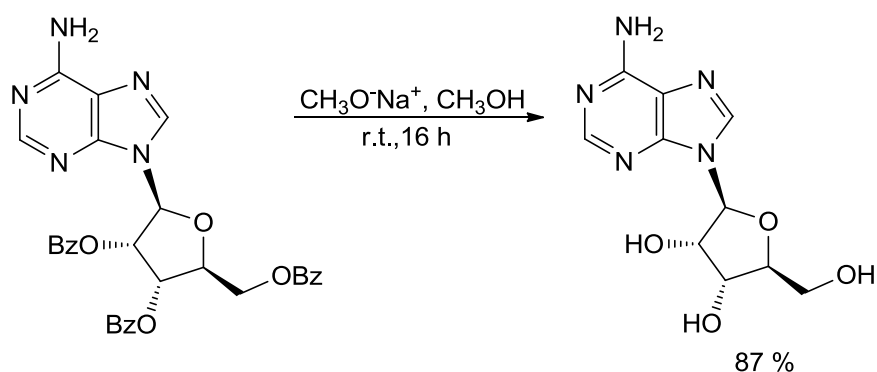


2.2.2 Deprotekce

Při syntéze ribonukleosidů je finálním krokem deprotekce funkčních skupin ribózy, což znamená odstranění chránících skupin za opětovného získání skupin hydroxylových. Chránící skupiny by měly být lehce odstranitelné a neměly by negativně interagovat s finálními látkami. Na **Schématech 10 – 12** jsou uvedeny tři běžně používané způsoby provedení deprotekce purinových sloučenin.

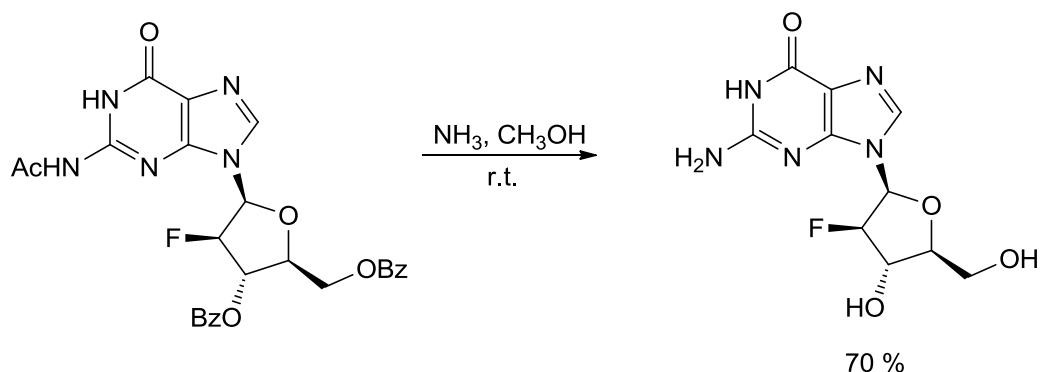
Schéma 10 znázorňuje debenzoylaci ribózy pomocí methanolátu sodného v metanolu za laboratorní teploty.²¹

Schéma 10



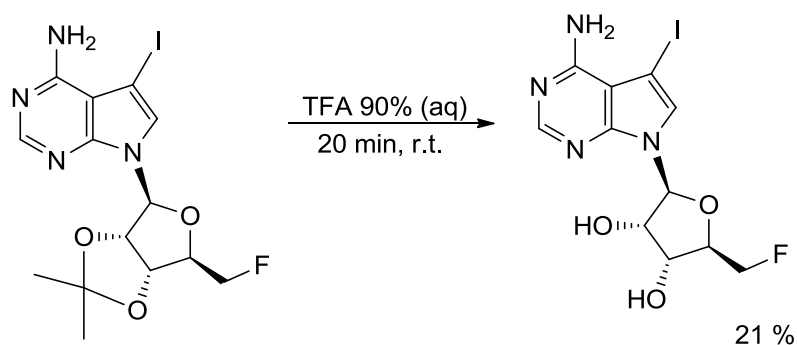
Na **Schématu 11** je popsána debenzoylace modifikované ribózy nesoucí na atomu uhlíku C3 ribózy atom fluoru. V tomto případě je rovněž chráněna amino skupina v poloze C2 purinového kruhu, a sice acylovou skupinou.²² Jedná se tak zároveň o deacetylaci a debenzoylaci pomocí amoniakem nasyceného methanolu.²³

Schéma 11



Na **Schématu 12** je ilustrována deprotektce chráněného 7-deazapurinového nukleosidu pomocí 90% kyseliny trifluoroctové za laboratorní teploty.²⁴

Schéma 12

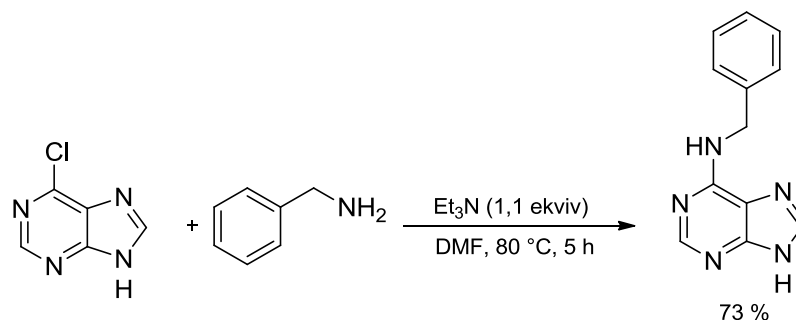


2.3 Nukleofilní aromatické substituce do polohy 6 purinového kruhu

2.3.1 „Klasické“ metody nukleofilní substituce s tvorbou vazby C–N

Nukleofilní aromatická substituce (nejčastěji halogenu) představuje jeden z nejčastěji využívaných principů zavádění aminů do polohy C6 na purinovém kruhu, přičemž dochází k tvorbě vazby C–N. Jako příklad lze uvést reakci 6-chlor-9H-purinu s benzylaminem v přítomnosti Et₃N jako báze, kdy jako rozpouštědlo byl použit DMF. Reakce byla prováděna při teplotě 80 °C po dobu necelých 5 hodin a požadovaný produkt byl získán v relativně vysokém výtěžku 73 % (**Schéma 13**).²⁵

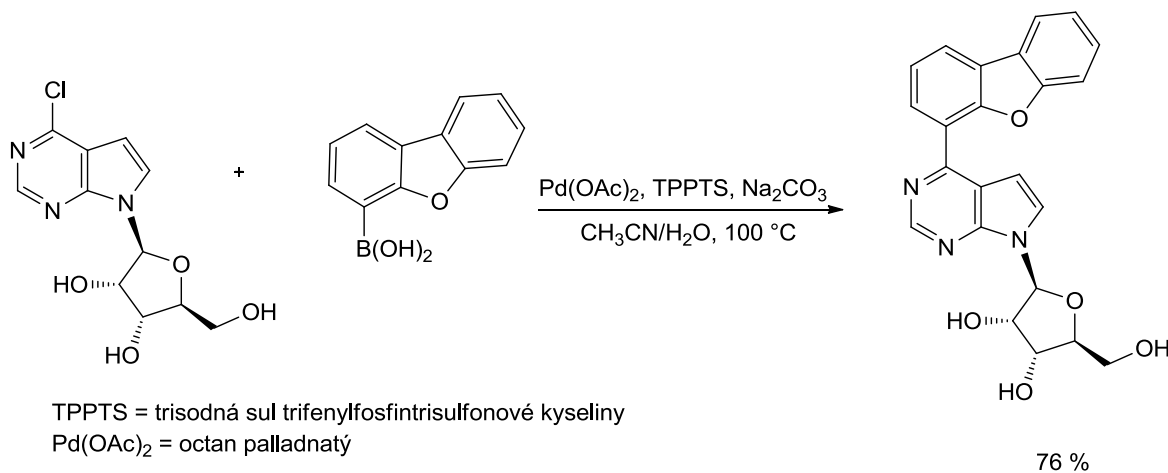
Schéma 13



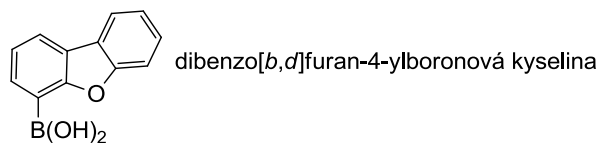
2.3.2 Palladiem katalyzované substituce podporující vznik vazby C–C

V případě purinového kruhu se nejvíce využívá nukleofilní substituce atomu chlóru v poloze C6 purinu. Na **Schématu 14** je popsána nukleofilní aromatická substituce halogenu v poloze 6 purinového kruhu na 7-deazapurinových ribonukleosidech. Tato syntéza byla použita k přípravě látek aktivních proti *Mycobacterium bovis*.²⁶

Schéma 14

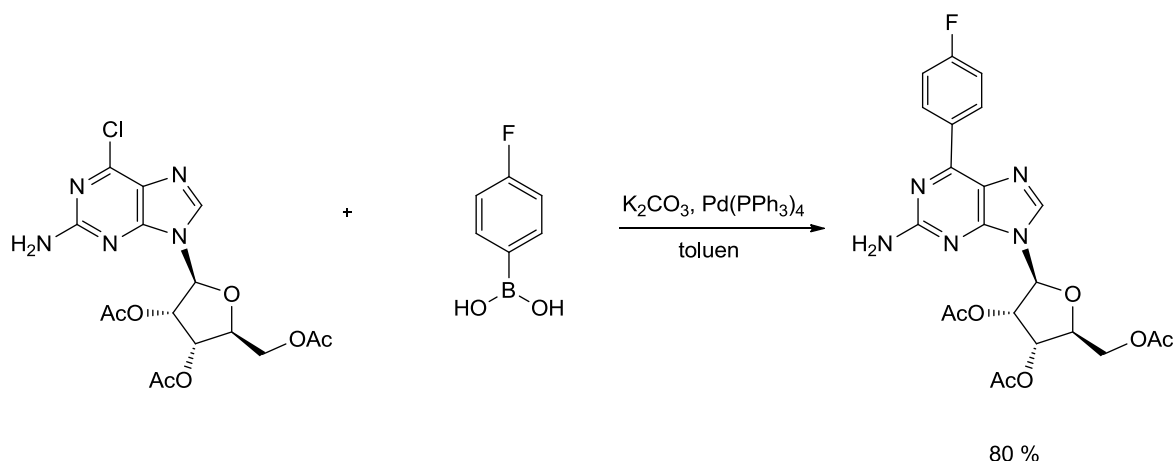


TPPTS = trisodná sul trifenylfosfintrisulfonové kyseliny
 Pd(OAc)₂ = octan palladnatý



Reakce na **Schématu 15** je jedna z palladiem katalyzovaných Suzuki-Miyaura cross couplingových reakcí.²⁷ Skupina profesora Hocka použila při syntéze 7-halogenovaných 6-methyl-7-deazapurinových ribonukleosidů nebo 6-arylpurinových ribonukleosidů jako katalyzátor tetrakis(trifenylfosfin)palladium (Pd(PPh₃)₄).²⁸ Výchozími látkami reakce jsou 6-halogenpurin a arylboritá nebo alkenylboritá kyselina. Produkt reakce byl získán v dobrém výtěžku (80 %).²⁹

Schéma 15



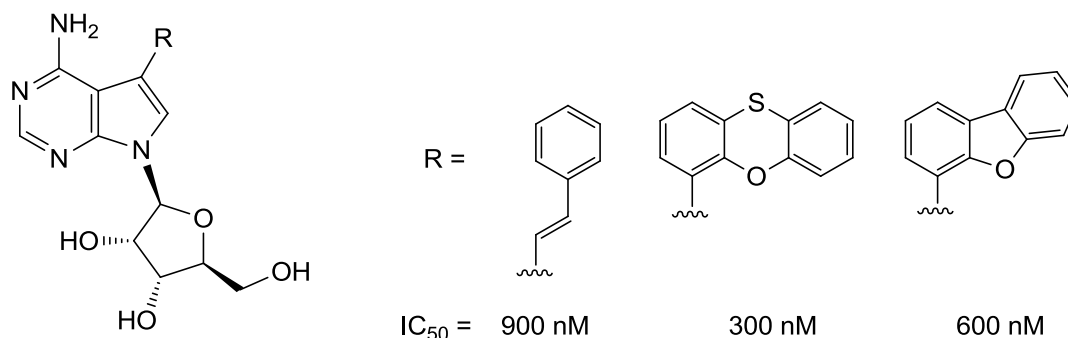
Dalším používaným palladiovým katalyzátorem je chlorid palladnatý, který tvoří s trifenylfosfinem komplexní sloučeninu, ze které redukcí vzniká aktivní komplex.³⁰ Děje se tak v přebytku trialkylaminů, organokovů nebo fosfinů.³¹

2.4 Nové poznatky ve výzkumu biologicky aktivních purinových látek a ribonukleosidů

Moderní technologie a pokroky v modifikacích známých syntéz umožňují efektivnější přípravu biologicky aktivních látek na bázi purinových nukleosidů, ale i jinak substituovaných purinů. Takové látky lze nalézt téměř v každé skupině léčiv. Níže je zmíněno několik významných biologicky aktivních látek s potenciálem ke schválení v pokročilých schvalovacích řízeních a konečné patentové registraci léčiva. Jsou jimi např. roscovitin nebo Ad-ASM.

2.4.1 Antituberkulotika

Podle Snášela³² se při syntéze rozmanitých derivátů 7-substituovaných 7-deazaribonukleosidů zjistilo, že deriváty obsahující v této poloze relativně objemné substituenty mohou účinně inhibovat adenosin kinázu (ADK) v bakteriích *Mycobacterium tuberculosis* a zároveň nejsou nebezpečné pro člověka, neboť lidskou ADK neinhibují. Bylo zjištěno, že tyto sloučeniny, jejichž strukturní vzorce jsou uvedeny na **Obrázku 6**, vykazují inhibiční účinek při koncentracích IC_{50} v řádech nanomolů. Podle autorů byly téměř všechny látky inhibičně aktivní proti bakteriím *Mycobacterium bovis*.²⁶

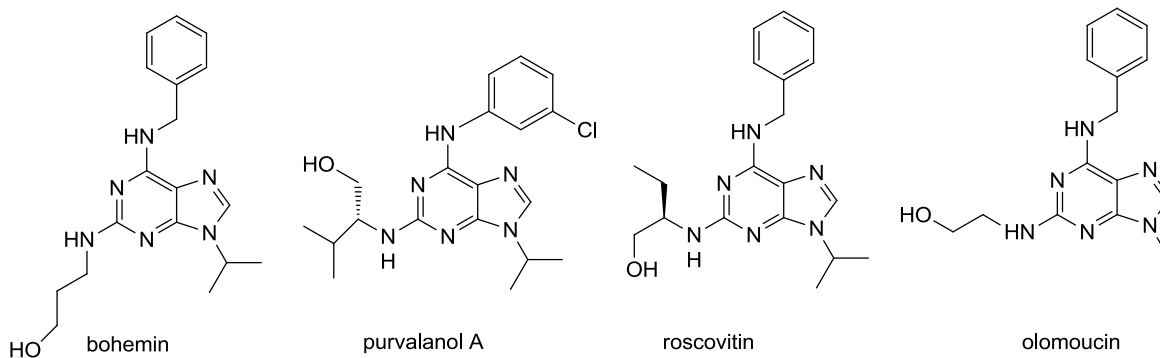


Obrázek 6: Strukturální vzorce účinných antituberkulotik.

2.4.2 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou důležité při regulaci buněčného cyklu, transkripci, diferenciaci buněk nebo vyvolání apoptózy (usmrcení buňky). Jsou představiteli jedné z důležitých skupin potenciálních budoucích cílů moderních cytostatických léčiv, protože je jejich aktivita v mnohých onemocněních nějakým způsobem narušována. V současné době již probíhá klinické testování účinnosti několika látek inhibujících CDK. Princip jejich protinádorové cytotoxické aktivity není ale zatím zcela rozluštěn.³³

Sloučeniny jako jsou 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu jsou jedny z nejstarších inhibitorů CDK. Mezi takové sloučeniny patří např. olomoucín, jehož cytostatické působení není nijak ohromující, avšak jeho další vlastnosti jsou dobře využitelné. Olomoucín vykazuje silné antimitotické účinky a snadnou modifikovatelnost struktury. Tyto vlastnosti přivedly vědce k myšlence na prozkoumání dalších substituovaných purinů ve snaze naleznout látky podobné olomoucínu. Podařilo se syntetizovat látky roskovitin a bohemín, které jsou analogy olomoucínu s dvacetkrát vyšším inhibičním účinkem, než má samotný olomoucín. Tyto látky mají specifitější účinky a větší možnosti využití v klinické praxi. Do této skupiny patří také purvalanol A, který zastavuje mitózu v lidských buňkách vazivové tkáně a inhibuje CDK1 a CDK2. Roskovitin a purvalanol A jsou ve 2. fázi klinického testování. Struktury vybraných nízkomolekulárních inhibitorů CDK jsou znázorněny na **Obrázku 7**.³⁴



Obrázek 7: Strukturální vzorce vybraných inhibitorů CDK.

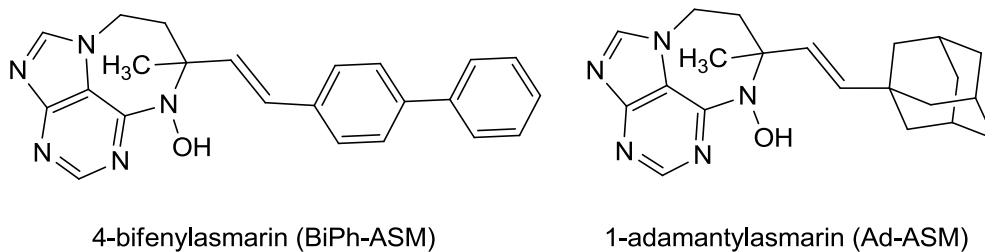
2.4.3 Cytostatika

Na **Obrázku 8** jsou znázorněny syntetické deriváty přírodních asmarinů, které byly nalezeny v pobřežních oblastech Rudého moře v houbách rodu *Raspailia*. Vyznačují se nanomolární cytotoxickou aktivitou proti sedmi nádorovým buněčným liniím. Tyto látky jsou strukturálně odvozeny od *N*-hydroxypurin diazepinu, který má roli farmakoforu (část molekuly, která nese farmakologický účinek). Minimální inhibiční koncentrace jsou uvedeny v **Tabulce 2**.¹

Tabulka 2: Koncentrace vybraných látek proti nádorovým buněčným liniím.

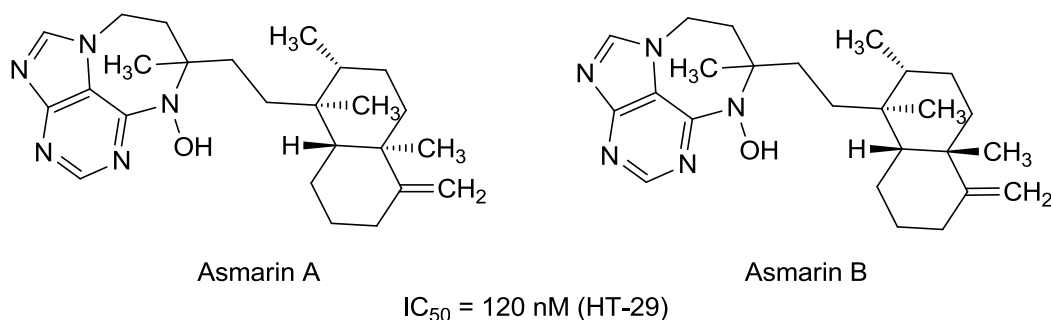
Buněčné linie	Ad-ASM	BiPh-ASM
	c [nmol·l ⁻¹]	
MDA-MB 231	511	455
MCF 7	455	312
HEK 293	455	295
HL60	199	270
HeLa	714	572
JurKat	472	471
HT29	607	590

MDA-MB 231 – prsní adenokarcinom; MCF 7 – karcinom prsu; HEK 293 – embryotické ledvinové buňky; HL-60 – lidská myeloidní leukémie; HeLa – děložní adenokarcinom; JurKat – akutní lymfatická leukémie; HT29 – kolorektální adenokarcinom.



Obrázek 8: Vybrané synteticky připravené deriváty asmarinu.

Při přípravě umělých derivátů asmarinu se vycházelo z molekul přírodních Asmarinů A a B (**Obrázek 9**), ve kterých byl mimo *N*-hydroxypurin diazepinového farmakoforu identifikováno další biologicky aktivní jádro, a sice substituovaný klerodanový skelet. Díky druhému farmakoforu jsou inhibiční koncentrace nižší ($IC_{50} = 120$ nM) než u synteticky připravených molekul na bázi asmarinů. Nicméně, vzhledem k relativně vzácnému výskytu mořských hub rodu *Raspailia* je volena strategie syntézy nových látek, před získáváním vysoce biologicky aktivních látek z daných hub.¹



Obrázek 9: Vybrané přírodní deriváty asmarinu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ

Teploty tání (t_f) byly měřeny na přístroji Büchi Melting Point B-540 a nejsou korigovány. Elementární analýzy (C, H, N) byly prováděny na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental analyzer (Thermo Fischer Scientific). TLC analýzy byly prováděny na deskách typu TLC Silica gel 60F₂₅₄ firmy Merck KgaA. Použité mobilní fáze: CHCl₃/EA (7/3, v/v), CHCl₃/MeOH (5/1, v/v), CHCl₃/MeOH (8/1, v/v), CHCl₃/MeOH (12/1, v/v), EA/MeOH (8/1, v/v), CHCl₃/EtOH (19/1, v/v), PE/EA (1/1, v/v), PE/EA (4/1, v/v), PE/EA (8/1, v/v). NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 500 při frekvenci 500,13 MHz (¹H) a 125,77 MHz pro (¹³C). Jako interní standard bylo používáno rozpouštědlo (¹H: δ (reziduální CHCl₃) = 7,27 ppm; δ (DMSO-*d*₅) = 2,50 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃) = 77,23 ppm; δ (DMSO-*d*₆) = 39,52 ppm. Při interpretaci protonových spekter bylo použito následujících zkratk: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet). Infračervená spektra byla měřena na přístroji iS 10, Smart omni – Transmission nebo Spektrometr FTIR ALPHA – T, Bruker v podobě KBr tablet. Při vypisování spekter byly použity následující zkratky značící intenzitu absorpčního pásu: w (slabá), m (střední), s (silná), případně také jeho šířku: b (široký pás). Kvantitativní analýza reakčních směsí byla měřena na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí Shimadzu GCMS-QP2010 vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Chromatografická kolona: Equity-1 (30 m; 1 mm); nosný plyn: helium (konstantní průtok 203 cm³·s⁻¹); teplotní program: 100 °C/7 min, 25 °C/min zvýšení na teplotu 250 °C, která byla držena patřičně dlouhou dobu; teplota nástřiku: 250 °C; iontový zdroj: 200 °C, 70 eV. Při vypisování hmotnostních spekter byly brány v úvahu signály s relativním zastoupením alespoň 5% (neplatí pro molekulové ionty). Charakterizace vybraných fragmentů pozorovaných v hmotnostních spektrech je uváděna v závorce za hodnotou *m/z*. ESI-IT-MS analýzy byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním a negativním módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny v podobě roztoku CH₃OH/H₂O (1/1, v/v) o koncentraci 0,5 µg·ml⁻¹ kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 µl·min⁻¹. Ostatní parametry byly následující: napětí na kapiláře: -4,2 kV; teplota sušícího plynu (220 °C); průtok sušícího plynu (6 dm³·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 příslušného iontu, měřena pomocí kolizí indukované disociace (z angl. collision-induced dissociation, CID). Jako kolizní plyn bylo použito helium.

Všechny použité reaktanty, činidla a rozpouštědla byly zakoupeny z komerčních zdrojů a nadále nebyly nijak dodatečně čištěny.

4 SYNTÉZA 1-ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ

4.1 Nitrace adamantyl(fenyl)methanonu

Ve 25 cm³ baňce byla připravena nitrační směs sestávající z H₂SO₄ (270 μl; 0,01 mmol) a HNO₃ (5,54 cm³; 0,13 mol). Do reaktoru vychlazeného pomocí kryostatu na -15 °C bylo pipetováno 13,5 cm³ acetanhydridu (0,14 mmol), k němuž byla za stálého chlazení po kapkách přidávána nitrační směs (cca 30 minut). Poté byl do vzniklého roztoku opatrně přidán příslušný 1-adamantyl(fenyl)methanon (1,35 g; 5,6 mmol), který byl rozpuštěn v 8,1 cm³ acetanhydridu (0,09 mmol). Poté byla reakční směs za stálého chlazení míchána dalších 30 minut, přičemž její průběh byl monitorován pomocí TLC. Po úplném zreagování výchozího ketonu byla reakční směs nalita na ledovou tříšť. Vodná fáze byla extrahována 5 × 20 cm³ diethyletheru (DEE). Spojené organické podíly byly promyty 4 × 20 cm³ K₂CO₃ (1,16 M vodný roztok), sušeny přes noc nad K₂CO₃ a poté odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

(1-Adamantyl)(3-nitrofenyl)methanon (3)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 4,19 g (72 %). Titulní látka byla získána po čišťení sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 8/1, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 1,11 g (19 %); *t*_i = 79–83 °C.

IR (KBr): 3101 (w), 2913 (s), 2892 (s), 2849 (s), 1667 (s), 1610 (m), 1525 (s), 1468 (w), 1450 (w), 1345 (s), 1270 (m), 1223 (m), 1177 (w), 1807 (m), 996 (m), 910 (m), 879 (m), 827 (m), 809 (m), 730 (s), 710 (s), 672 (m), 646 (w) cm⁻¹. GC-MS: (*t*_R = 22,03 min); *m/z* (%): 285 (M⁺, <1), 136 (AdH, 11), 135 (Ad, 100), 107 (8), 93 (15), 79 (14), 67 (6).

(C₁₇H₁₉NO₃) vyp. složení: 71,56 % C; 6,71 % H; 4,91 % N

exp. složení: 71,54 % C; 7,01 % H; 4,77 % N

(1-Adamantyl)(4-nitrofenyl)methanon (4)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 4,19 g (72 %). Přechištěný produkt byl získán po čišťení sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 8/1, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 1,17 g (20 %); *t*_i = 126–131 °C.

IR (KBr): 2905 (s), 2851 (s), 2361 (w), 1688 (s), 1600 (m), 1522 (s), 1454 (m), 1347 (s), 1273 (m), 1242 (m), 1180 (w), 1103 (w), 990 (m), 932 (m), 855 (s), 829 (m), 809 (m), 713 (m), 696 (m), 664 (w), 568 (w), 468 (w) cm^{-1} . GC-MS: ($t_R = 22,88$ min); $m/z(\%)$: 285 (M^+ , <1), 136 (AdH, 11), 135 (Ad, 100), 120 (14), 107 (8), 93 (16), 79 (15) 67 (7).

($C_{17}H_{19}NO_3$) vyp. složení: 71,56 % C; 6,71 % H; 4,91 % N

exp. složení: 71,49 % C; 6,94 % H; 4,83 % N

4.2 Reakce 1-adamantyl(nitrofenyl)ketonů s ethan-1,2-dithiolem

Ve 100 cm^3 baňce byl rozpuštěn příslušný (1-adamantyl)(nitrofenyl)methanon (1,0 g; 3,5 mmol) v 17 cm^3 dichlormethanu. Do vzniklého roztoku byl přidán ethan-1,2-dithiol (398 μl ; 4,75 mmol). Reakční směs byla následně za chlazení směsí voda/led/NaCl míchána po dobu 40 minut. Poté byl po kapkách přidán $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (1,1 cm^3 ; 0,19 mmol) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin, přičemž průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Reakční směs byla zředěna cca 20 cm^3 CH_2Cl_2 , organická fáze byla promyta 3 \times 10 cm^3 10% vodného roztoku NaOH a 2 \times 20 cm^3 nasyceného roztoku NaCl a poté sušena přes noc nad Na_2SO_4 . Po odpaření rozpouštědla na RVO byl získán chromatograficky čistý produkt, který byl použit do další reakce bez nutnosti jakékoliv purifikace.

2-Adamantyl-2-(3-nitrofenyl)-1,3-dithiolan (5)

Titulní látka byla získána v podobě světle zeleného krystalického prášku ve výtěžku 1,10 g (89 %); $t_f = 178\text{--}181$ °C.

^1H NMR (CDCl_3): δ 1,55 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,78 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 2,02 (m, 3H, $\text{CH}(\text{Ad})$); 2,97 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3,30 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 7,40 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ph); 8,14 (m, 2H, Ph); 8,69 (s, 1H, Ph) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 28,9 (CH); 36,2 (CH_2); 38,7 (CH_2); 39,6 (CH_2); 40,5 (C); 85,9 (C); 121,9 (CH); 125,5 (CH); 127,0 (CH); 136,5 (CH); 146,3 (C); 146,8 (C) ppm. IR (KBr): 2911 (s), 2850 (s), 1518 (s), 1420 (w), 1343 (s), 1304 (w), 1282 (w), 1103 (w), 979 (m), 839 (m), 812 (m), 730 (s), 686 (m), 616 (w) cm^{-1} . GC-MS: ($t_R = 61,30$ min); $m/z(\%)$: 361 (M^+ , <1), 210 (24), 196 (10), 136 (AdH, 12), 135 (Ad, 100), 107 (10), 93 (16), 81 (5), 79 (19), 77 (6), 67 (8), 41 (6).

($C_{19}H_{23}NO_2S_2$) vyp. složení: 63,12 % C; 6,41 % H; 3,87 % N; 17,74 % S

exp. složení: 63,08 % C; 6,48 % H; 3,81 % N; 17,74 % S

2-Adamantyl-2-(4-nitrofenyl)-1,3-dithiolan (6)

Titulní látka byla získána v podobě světle zeleného krystalického prášku ve výtěžku 1,23 g (97 %); $t_f = 190\text{--}195\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR (CDCl_3): δ 1,48–1,62 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,82 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,97 (m, 3H, $\text{CH}(\text{Ad})$); 3,01 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3,25 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 7,99 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, Ph); 8,12 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, Ph) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 28,6 (CH); 35,9 (CH_2); 38,4 (CH_2); 39,2 (CH_2); 40,7 (C); 86,0 (C); 121,0 (CH); 131,5 (CH); 146,2 (C); 151,1 (C) ppm. IR (KBr): 2930 (s), 2903 (s), 2844 (s), 1589 (m), 1514 (s), 1447 (w), 1400 (w), 1345 (s), 1307 (w), 1242 (w), 1110 (m), 978 (m), 852 (m), 809 (w), 728 (m), 696 (m), 502 (w) cm^{-1} . GC-MS: ($t_R = 69,81$ min); $m/z(\%)$: 361 (M^+ , <1), 210 (9), 196 (18), 136 (AdH, 14), 135 (Ad, 100), 107 (9), 93 (15), 79 (18), 77 (5), 67 (8), 41 (6).

($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}_2$) vvp. složení: 63,12 % C; 6,41 % H; 3,87 % N; 17,74 % S
exp. složení: 62,71 % C; 6,43 % H; 3,80 % N; 18,33 % S

4.3 Redukce nitrodithiolanů na aminodithiolany

V 250 cm^3 baňce byl příslušný 2-(1-adamantyl)-2-(3-nitrofenyl)-1,3-dithiolan (1,19 g; 3,28 mmol) rozpuštěn ve 100 cm^3 propan-2-olu. Do vzniklého roztoku bylo přidáno 20 cm^3 $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) a práškové železo (383 mg; 6,86 mmol). Další porce práškového železa byly do reakční směsi přidávány v okamžiku, co byla předchozí porce spotřebována a TLC neindikovalo úplnou konverzi výchozí látky. Po ukončení reakce byla reakční směs zalkalizována 10% vodným roztokem NaOH (80 cm^3). Vodná fáze byla následně extrahována DEE ($7 \times 20\text{ cm}^3$). Spojené organické podíly byly promyty 20 cm^3 nasyceného roztoku NaCl , vysušeny nad síranem sodným a odpařeny za vakua. Chromatograficky čistý produkt byl použit do další reakce bez nutnosti jakékoliv purifikace.

2-(1-Adamantyl)-2-(3-aminofenyl)-1,3-dithiolan (7)

Titulní látka byla získána v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžku 1,1 g (97 %); $t_f = 231\text{--}235\text{ }^\circ\text{C}$.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 1,42–1,58 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,75 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,92 (m, 3H, $\text{CH}(\text{Ad})$); 2,96 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3,23 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 4,99 (bs, 2H, NH_2); 6,40 (m, 1H, Ph); 6,80 (m, 1H, Ph); 6,87 (m, 1H, Ph); 6,91 (m, 1H, Ph) ppm. IR (KBr): 3444 (m), 2258 (m), 2901 (s), 2846 (s), 1616 (s), 1596 (s), 1484 (s), 1441 (s), 1356 (m), 1341

(m), 1305 (m), 1277 (s), 1145 (w), 1103 (w), 978 (w), 867 (m), 779 (s), 746 (s), 701 (s) 466 (w) cm^{-1} . GC-MS: ($t_R = 47,60$ min); $m/z(\%)$: 331 (M^+ , 9), 198 (9), 197(12), 196(M^+ -Ad, 100), 136 (AdH, 16), 135 (Ad, 11), 93 (9), 92(7), 79(10), 65(5).

($C_{19}H_{25}NS_2$) vyp. složení: 68,83 % C; 7,60 % H; 4,22 % N; 19,34 % S
exp. složení: 68,37 % C; 7,63 % H; 4,22 % N; 19,81 % S

2-(1-Adamantyl)-2-(4-aminofenyl)-1,3-dithiolan (8)

Titulní látka byla získána v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžku 0,96 g (88 %); $t_f = 170\text{--}173$ °C.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,41–1,57 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,71 (m, 6H, $\text{CH}_2(\text{Ad})$); 1,91 (m, 3H, $\text{CH}(\text{Ad})$); 2,92 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 3,23 (m, 2H, $\text{SCH}^{\text{A}}\text{H}^{\text{B}}$); 4,99 (bs, 2H, NH_2); 6,43 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ph); 7,28 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ph) ppm. IR (KBr): 3465 (m), 3417 (m), 3338 (m), 2900 (s), 2846 (s), 1621 (s), 1506 (s), 1448 (w), 1278 (m), 1162 (w), 1105 (w), 978 (w), 835 (m), 651 (m), 530 (m) cm^{-1} . GC-MS: ($t_R = 51,38$ min); $m/z(\%)$: 331 (M^+ , <1), 198 (10), 197(12), 196(M^+ -Ad, 100), 136 (AdH, 21), 79(6).

($C_{19}H_{25}NS_2$) vyp. složení: 68,83 % C; 7,60 % H; 4,22 % N; 19,34 % S
exp. složení: 67,56 % C; 7,58 % H; 4,17 % N; 19,53 % S

4.4 Desulfurizace aminodithiolanů

Příprava Raneyova niklu

Ve 100 cm^3 Erlenmayerově baňce bylo, za stálého míchání a chlazení směsí voda/led, rozpuštěno 16 g (0,4 mol) hydroxidu sodného v 63 cm^3 H_2O . Po 45 minutách bylo do vzniklého roztoku opatrně přidáno 12,6 g Raneyova niklu (Ra-Ni) v přiměřených dávkách tak, aby docházelo k vytváření H_2 . Po přidavku veškerého Ra-Ni byla směs míchána při laboratorní teplotě po dobu 12 hodin. Zásaditá suspenze byla poté promývána destilovanou vodou do neutrálního pH. Po neutralizaci byla směs promyta 10 \times 10 cm^3 dioxanu a poté ještě 3 \times 10 cm^3 dioxanu zbaveného vody pomocí běžných postupů.

Příslušný 2-(1-adamantyl)-2-aminofenyl-1,3-dithiolan (483 mg; 1,46 mmol) byl rozpuštěn v 20 cm^3 dioxanu. Po přidání 6,3 g Ra-Ni byla reakční směs refluxována pod ochrannou argonovou atmosférou do té doby, než byla spotřebována veškerá výchozí látka (monitorováno pomocí GC-MS). Poté byla reakční směs zfiltrována a do získaného filtrátu bylo přidáno 100 cm^3 destilované vody. Vodná fáze byla následně extrahována 4 \times 20 cm^3

CH₂Cl₂. Spojené organické podíly byly promyty 20 cm³ nasyceného roztoku NaCl, vysušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

3-(1-Adamantylmethyl)anilin (11)

Titulní látka byla získána v podobě hnědého oleje ve výtěžku 322 mg (77 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,44 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,54 (m, 3H, CH₂(Ad)); 1,62 (m, 3H, CH₂(Ad)); 1,90 (m, 3H, CH(Ad)); 2,18 (s, 2H, AdCH₂Ph); 4,85 (s, 2H, NH₂); 6,23 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, Ph); 6,29 (m, 1H, Ph); 6,39 (m, 1H, Ph); 6,87 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, Ph) ppm. IR (KBr): 3446 (s), 3351 (s), 3218 (w), 2900 (s), 2844 (s), 1617 (s), 1602 (s), 1490 (s), 1284 (m), 1168 (m), 784 (m), 717 (m), 698 (s), 611 (w), 455 (m) cm⁻¹. GC-MS: (t_R = 17,41 min); *m/z*(%): 242 (6), 241 (M⁺, 28), 136 (AdH, 7), 135 (Ad, 64), 107 (13), 106 (100), 93 (20), 91 (7), 81 (5), 79 (23), 77 (10), 67 (8), 55 (5), 41 (7).

(C₁₇H₂₃N) vyp. složení: 84,56 % C; 9,60 % H; 5,80 % N

exp. složení: 84,32 % C; 9,61 % H; 5,78 % N

4-(1-Adamantylmethyl)anilin (12)

Titulní látka byla získána v podobě hnědého oleje ve výtěžku 269 mg (77 %).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,39 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,51–1,59 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,87 (m, 3H, CH(Ad)); 2,25 (s, 2H, AdCH₂Ph); 4,68 (s, 2H, NH₂); 7,29 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ph); 7,42 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ph) ppm. IR (KBr): 3447 (m), 3350 (s), 3219 (m), 2901 (s), 2845 (s), 1616 (s), 1604 (s), 1492 (s), 1283 (w), 1169 (m), 784 (m), 718 (m), 699 (s), 611 (w), 460 (m) cm⁻¹. GC-MS: (t_R = 17,64 min); *m/z*(%): 242 (7), 241 (M⁺, 35), 136 (AdH, 8), 135 (Ad, 71), 107 (18), 106 (100), 93 (18), 91 (6), 79 (22), 78 (11), 67 (8), 41 (7).

(C₁₇H₂₃N) vyp. složení: 84,56 % C; 9,60 % H; 5,80 % N

exp. složení: 84,49 % C; 8,96 % H; 5,64 % N

5 SYNTÉZA PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ

5.1 Chlorace hypoxanthinu

V baňce o objemu 100 cm³ byl rozpuštěn hypoxanthin (**13**; 1,27 g; 9,33 mmol) v dimethylanilinu (DMA; 3,27 cm³; 0,04 mmol). Vzniklý roztok byl míchán v ledové lázni při teplotě 0 °C. Následně byl k reakční směsi přikapáván POCl₃ (32 cm³; 0,35 mmol). Po přidání veškerého POCl₃ byla reakční směs míchána při teplotě 120 °C pod ochrannou argonovou atmosférou. Po třech hodinách byla reakce ukončena (monitorováno pomocí TLC). Z reakční směsi bylo na RVO odpařeno rozpouštědlo a získaný produkt olejovité konzistence byl nalit na ledovou tříšť, přičemž po rozpuštění veškerého ledu bylo do směsi přidáno 13 cm³ NH₄OH (0,56 mmol). Poté byla vodná fáze extrahována 3 × 20 cm³ CHCl₃. Spojené organické podíly byly vysušeny nad Na₂SO₄, bylo ponecháno přes noc a odpařeno na RVO. Do baňky obsahující surový produkt bylo poté přidáno 10 cm³ CH₃CN. Vzniklý roztok byl přiveden k varu pomocí horkovzdušné pistole a zfiltrován přes skládaný filtr. Získaný filtrát byl odpařen na RVO.

6-Chlor-9H-purin (**14**)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 837 mg. Titulní látka byla získána po čištní sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 5/1, v/v) v podobě žlutého krystalického prášku ve výtěžku 731 mg (51 %); $t_r = >300$ °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8,67 (s, 1H, NC²HN); 8,73 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz, NC⁸HN); 13,90 (s, 1H, NH) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 130,5 (C); 145,9 (CH); 148,6 (C); 151,5 (CH); 152,9 (C) ppm. IR (KBr): 3065 (s), 2805 (s), 2359 (m), 1604 (s), 1574 (s), 1490 (m), 1445 (m), 1391 (s), 1325 (s), 1285 (s), 1235 (s), 1144 (m), 989 (s), 925 (m), 850 (m), 640 (s), 604 (m), 508 (m) cm⁻¹. GC-MS: ($t_r = 13,43$ min); m/z (%): 156 ((³⁷Cl)M⁺, 32), 155 (7), 154 ((³⁵Cl)M⁺, 100), 120 (6), 119 (85), 100 (7), 92 (23), 86 (5), 73 (23), 67 (5), 65 (18), 64 (6), 53 (7).

(C₅H₃ClN₄) vyp. složení: 38,86 % C; 1,96 % H; 36,25 % N
exp. složení: 38,83 % C; 1,97 % H; 36,29 % N

5.2 Ribosylace 6-chlor-9*H*-purinu

Metoda A

V baňce o objemu 50 cm³ bylo v 8 cm³ bezvodého CH₃CN rozsuspendováno 100 mg 6-chlor-9*H*-purinu (0,65 mmol) a 653 mg 1-*O*-acetyl-3,4,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranózy (**15**; 1,29 mmol). Vzniklá suspenze byla míchána pod ochrannou argonovou atmosférou při laboratorní teplotě. Následně bylo do suspenze přes silikové septum nadávkováno 176 µl trimethylsilylesteru kyseliny trifluorsulfonové (TMSOTf; 0,97 mmol), přičemž bylo pozorováno rozpuštění všech reaktantů. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Po spotřebování výchozího purinu (5 hodin) bylo do reakční směsi přidáno 25 cm³ H₂O a byla míchána dalších 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs extrahována 5 × 20 cm³ ethyl-acetátu. Spojené organické podíly byly promyty 20 cm³ nasyceného roztoku NaCl, vysušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

Metoda B

V baňce o objemu 50 cm³ byl ve 4 cm³ CH₃CN rozsuspendován 6-chlor-9*H*-purin (100 mg; 0,65 mmol). Vzniklá suspenze byla míchána pod ochrannou argonovou atmosférou při laboratorní teplotě. Následně bylo přes silikonové septum přidáno 265 µl bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA; 1,29 mmol) a vzniklý roztok byl míchán při teplotě 75 °C po dobu 6 hodin. Poté byly do reakční směsi přidány další 3 cm³ CH₃CN a 1-*O*-acetyl-3,4,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranózy (326 mg; 0,64 mmol). Dále bylo do reakční směsi přes silikonové septum přidáno TMSOTf (116 µl; 0,65 mmol). Reakční směs byla další 2 hodiny míchána při teplotě 75 °C a poté 12 hodin za laboratorní teploty. Po uplynutí této doby indikovalo TLC zreagování veškeré výchozí látky. Do reakční směsi bylo přidáno 25 cm³ H₂O a směs byla míchána dalších 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla reakční směs extrahována 7 × 20 cm³ CHCl₃. Spojené organické podíly byly promyty 20 cm³ nasyceného roztoku NaCl, vysušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny na RVO.

6-Chlor-9-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranosyl)-9*H*-purin (**16**)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 716 mg (metoda A) a 436 mg (metoda B). Titulní látka byla získána po čišťení sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 269 mg (69 %, metoda A) a 315 mg (79 %, metoda B); $t_r = 77\text{--}82$ °C (metoda A), $t_r = 65\text{--}73$ °C (metoda B).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 4,71 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{Rib})$); 4,83 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{Rib})$); 4,92 (m, 1H, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,29 (t, 1H, $J = 5,0$ Hz, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,51 (t, 1H, $J = 5,0$ Hz, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,73 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, $\text{CH}(\text{Rib})$); 7,49 (m, 6H, Ph); 7,67 (m, 3H, Ph); 7,97 (m, 6H, Ph); 8,66 (s, 1H, NC^2HN); 8,95 (s, 1H, NC^8HN) ppm. ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 63,6 (CH_2); 71,1 (C); 73,6 (C); 80,0 (C); 87,4 (C); 128,8 (CH); 129,0 (CH); 129,2 (CH); 129,2 (CH); 129,7 (CH); 129,9 (CH); 132,2 (CH); 134,0 (C); 134,4 (C); 134,5 (C); 147,1 (CO); 150,1 (CO); 151,7 (CO); 152,2 (C); 164,9 (C); 165,1 (C); 165,9 (C) ppm. IR (KBr): 3065 (w), 2925 (w), 1727 (s), 1593 (m), 1560 (m), 1491 (w), 1451 (m), 1267 (s), 1122 (s), 1094 (s), 1025 (m), 937 (m), 710 (s), 635 (m) cm^{-1} . ESI-MS m/z (%): 1219,1 [$2 \cdot (^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (11), 1196,8 [$2 \cdot (^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{H}$] $^+$ (10), 637,2 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{K}$] $^+$ (42), 621,2 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (100), 599,2 [$(^{35}\text{Cl})\text{M} + \text{H}$] $^+$ (46).

($\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_8$) vyp. složení: 60,54 % C; 3,77 % H; 9,11 % N

exp. složení: 62,02 % C; 4,02 % H; 8,54 % N

5.3 Nukleofilní substituce atomu chloru sloučeniny 16

5.3.1 Reakce sloučeniny 16 s anilinem

Metoda C

V 50 cm^3 baňce bylo rozpuštěno 100 mg 6-chlor-9-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranosyl)-9*H*-purinu (0,16 mmol) v 10 cm^3 propan-2-olu. Do vzniklého roztoku byl přidán triethylamin (45 μl ; 0,33 mmol) a anilin (**17**; 30 μl ; 0,33 mmol). Reakční směs byla refluxována při teplotě 150 $^\circ\text{C}$ pod chlorkalciovým nástavcem. Po 10 hodinách bylo pomocí TLC zjištěno, že výchozí purin již není přítomen v reakční směsi. Z reakční směsi bylo odpařeno rozpouštědlo na RVO.

Metoda D

V 50 cm^3 baňce bylo v 10 cm^3 propan-2-olu rozpuštěno 160 mg 6-chlor-9-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-ribofuranosyl)-9*H*-purinu (0,26 mmol). Do vzniklého roztoku byl přidán anilin (**17**; 44 μl ; 0,49 mmol). Reakční směs byla refluxována při teplotě 150 $^\circ\text{C}$ pod chlorkalciovým nástavcem. Po 14 hodinách bylo pomocí TLC zjištěno, že výchozí purin již není přítomen v reakční směsi. Z reakční směsi bylo odpařeno rozpouštědlo na RVO.

***N*-fenyl-9-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*D*-ribofuranosyl)-9*H*-purin-6-amin (18)**

Surový produkt byl získán ve výtěžku 142 mg (metoda C) a 196 mg (metoda D). Čistý produkt byl získán opakovaným čištěním surového produktu sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/ethanol, 19/1, v/v) a (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 66 mg (60 %, metoda C) a 100 mg (57 %, metoda D); $t_t = 85\text{--}90\text{ }^\circ\text{C}$ (metoda C) a $t_t = 94\text{--}96\text{ }^\circ\text{C}$ (metoda D).

^1H NMR (CDCl_3): δ 4,71 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{Rib})$); 4,82 (m, 1H, $\text{CH}_2(\text{Rib})$); 4,89 (m, 1H, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,32 (t, 1H, $J = 5,0\text{ Hz}$, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,56 (t, 1H, $J = 5,0\text{ Hz}$, $\text{CH}(\text{Rib})$); 6,64 (d, 1H, $J = 5,0\text{ Hz}$, $\text{CH}(\text{Rib})$); 7,07 (m, 1H, Ph); 7,35 (m, 2H, Ph); 7,46–7,53 (m, 6H, Ph); 7,66 (m, 3H, Ph); 7,90–8,02 (m, 8H, Ph); 8,33 (s, 1H, NC^2HN); 8,58 (s, 1H, NC^8HN); 9,97 (s, 1H, C^6NHPh) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 63,2 (CH_2); 70,7 (C); 73,0 (C); 86,5 (C); 120,4 (C); 121,0 (C); 122,8 (C); 128,3 (CH); 128,6 (CH); 128,7 (CH); 129,2 (CH); 129,3 (CH); 133,4 (CH); 133,8 (CH); 133,9 (CH); 139,4 (CH); 141,2 (C); 149,1 (C); 152,2 (C); 164,5 (C); 164,6 (C); 165,4 (C) ppm. IR (KBr): 3369 (s), 3050 (m), 2925 (m), 2358 (w), 1727 (s), 1621 (s), 1583 (s), 1498 (m), 1477 (m), 1438 (m), 1378 (m), 1267 (s), 1178 (w), 1122 (s), 1070 (m), 1052 (m), 752 (m), 709 (s), 644 (m) cm^{-1} . ESI-MS m/z (%): 694,2 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (16), 678,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (21), 656,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100).

($\text{C}_{37}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_7$) vyp. složení: 67,78 % C; 4,46 % H; 10,68 % N
exp. složení: 68,09 % C; 4,82 % H; 9,98 % N

5.4 Nukleofilní substituce 6-chlor-9*H*-purinu**5.4.1 Reakce sloučeniny 14 s anilinem**

V 50 cm^3 baňce bylo v 10 cm^3 propan-2-olu rozpuštěno 150 mg 6-chlor-9*H*-purinu (0,97 mmol). Následně byl do vzniklého roztoku pomocí mikropipety přidán anilin (176 μl ; 1,94 mmol) a reakční směs byla míchána při teplotě 85 $^\circ\text{C}$ pod chlorkalciovým nástavcem. Po 4 hodinách bylo podle TLC indikováno spotřebování veškeré výchozí látky. Po vytemperování reakční směsi na laboratorní teplotu byla pozorována tvorba sraženiny, která byla následně odfiltrována za sníženého tlaku a získaný filtrační koláč byl několikrát promyt ledovým propan-2-olem. Získaný pevný podíl byl vysušen při teplotě 60 $^\circ\text{C}$. Matečný loup byl odpařen na RVO a získaný olejovitý produkt byl dále čištěn pomocí sloupcové chromatografie.

***N*-fenyl-9*H*-purin-6-amin (20)**

Titulní látka byla získána filtrací surového produktu v přítomnosti CHCl_3 v podobě světle zeleného krystalického prášku a dále byl produkt získán purifikací matečného louhu sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 8/1, v/v) ve výtěžku 173 mg (86 %); $t_r = >250$ °C.

^1H NMR (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$): δ 6,95 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ph); 7,29 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, Ph); 7,93 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Ph); 8,11 (s, 1H, NC^2HN); 8,39 (s, 1H, NC^8HN); 9,53 (s, 1H, C^6NHPh); 13,54 (s, 1H, N^9H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$): δ 117,8 (C); 119,9 (CH); 120,3 (CH); 122,0 (CH); 139,5 (CH); 139,7 (C); 151,0 (C); 151,3 (CH); 151,5 (C) ppm. IR (KBr): 3355 (w), 3052 (m), 2607 (w), 1733 (w), 1650 (s), 1583 (s), 1500 (s), 1452 (s), 1390 (m), 1218 (w), 1160 (w), 960 (m), 908 (m), 754 (s), 690 (m), 615 (m), 505 (m) cm^{-1} . GC-MS; ($t_R = 20,80$ min); $m/z(\%)$: 212 (7), 211 (M^+ , 56), 210 (100), 156 (5), 106 (7), 92 (10), 77 (19), 65 (8), 51 (9).

($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5$) vyp. složení: 62,55 % C; 4,29 % H; 33,16 % N
 exp. složení: 61,98 % C; 4,25 % H; 33,34 % N

5.5 Ribosylace *N*-fenyl-9*H*-purin-6-aminu**Metoda A**

Reakce byla provedena dle obecného postupu, který je uveden v kapitole 5.4 z výchozích navážek: purin **20** (70 mg; 0,33 mmol), sacharid (485 mg; 0,96 mmol), TMSOTf (132 μl ; 0,73 mmol).

Metoda B

Reakce byla provedena dle obecného postupu, který je uveden v kapitole 5.4 z výchozích navážek: purin **20** (70 mg; 0,33 mmol), sacharid (167 mg; 0,33 mmol), BSA (164 μl , 0,66 mmol), TMSOTf (60 μl , 0,33 mmol).

***N*-fenyl-9-(2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*D*-ribofuranosyl)-9*H*-purin-6-amin (18)**

Titulní látka byla získána čištěním surového produktu sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/ethyl-acetát, 7/3, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 196 mg (90 %, metoda A) a 38 mg (17 %, metoda B); $t_r = 86$ – 90 °C (metoda A) a $t_r = 83$ – 86 °C (metoda B).

Spektrální charakteristiky produktů získaných oběma použitými metodami se shodovaly s daty uvedenými v kapitole 5.3.1.

5.6 Deprotekce sloučeniny 18

371 mg sloučeniny **18** (0,55 mmol) bylo rozpuštěno v 10 cm³ CH₃OH. Do vzniklého roztoku byl přidán methanolát sodný (100 μl; 0,1 mmol) a reakční směs byla přes noc míchána při laboratorní teplotě. Po 16 hodinách byla podle TLC indikována nepřítomnost výchozího purinu. Do reakční směsi bylo přidáno 5 cm³ CHCl₃ a organická fáze byla odpařena na RVO.

N-fenyl-9-ribofuranosyl-9*H*-purin-6-amin (**19**)

Titulní látka byla získána po přečištění sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 5/1, v/v) v podobě bezbarvé pěny ve výtěžku 170 mg (86 %); *t*_t = 200–204 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,60 (m, 1H, CH₂); 3,70 (m, 1H, CH₂); 4,01 (m, 1H, CH); 4,20 (m, 1H, CH); 4,66 (m, 1H, CH); 5,22 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz, CHOH); 5,29 (m, 1H, CH); 5,48 (d, 1H, *J* = 6,1 Hz, CHOH); 5,97 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, CHOH); 7,06 (m, 1H, Ph); 7,34 (m, 2H, Ph); 7,93 (m, 2H, Ph); 8,41 (s, 1H, NC²HN); 8,54 (s, 1H, NC⁸HN); 9,91 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 61,6 (C); 70,6 (C); 73,7 (C); 85,9 (C); 87,9 (C); 120,4 (C); 120,9 (CH); 122,8 (CH); 128,4 (CH); 139,5 (CH); 140,7 (C); 149,4 (C); 151,9 (C); 152,2 (C) ppm. IR (KBr): 3334 (w), 3151 (m), 2921 (w), 1644 (s), 1589 (s), 1500 (s), 1479 (s), 1442 (m), 1216 (m), 1101 (s), 1060 (s), 983 (w), 784 (w), 750 (s), 632 (w) cm⁻¹. ESI-MS *m/z*(%): 366,0 [M+Na]⁺ (7), 344,1 [M+H]⁺ (100).

(C₁₆H₁₇O₅N₄) vyp. složení: 55,97 % C; 4,99 % H; 20,40 % N

exp. složení: 55,87 % C; 5,01 % H; 20,51 % N

6 SYNTÉZA NOVÝCH 6-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ PURINU

6.1 Reakce 6-chlor-9*H*-purinu s aromatickými adamantylem substituovanými aminy

6.1.1 Reakce s 3-(1-adamantylmethyl)anilinem

Ve 25 cm³ baňce bylo v 10 cm³ propan-2-olu rozpuštěno 100 mg 6-chlor-9*H*-purinu (0,65 mmol) a 312 mg aminu **11** (1,29 mmol). Po 5 hodinách TLC indikovalo úplnou konverzi výchozí látky. Rozpouštědlo bylo z reakční směsi odpařeno na RVO a k surovému produktu bylo přidáno 5 cm³ methanolu. Surový produkt byl zfiltrován přes fritu a filtrační koláč byl promyt studeným propan-2-olem.

N-(3-(1-adamantylmethyl)fenyl)-9*H*-purin-6-amin (**21**)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 310 mg. Titulní látka byla získána po přečištění krystalizací v podobě světle žlutého krystalického prášku ve výtěžku 156 mg (67 %); $t_f = 280\text{--}282\text{ }^\circ\text{C}$.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,48 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,54 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,91 (m, 3H, CH(Ad)); 2,37 (s, 2H, AdCH₂Ph); 6,92 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, Ph); 7,33 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ph); 7,57 (m, 1H, Ph); 7,80 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, Ph); 8,69 (s, 1H, NC²H^N); 8,73 (s, 1H, NC⁸H^N); 11,32 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 26,0 (C); 28,5 (CH); 37,0 (CH₂); 42,3 (CH₂); 50,9 (CH₂); 119,5 (C); 123,8 (CH); 127,38 (CH); 128,5 (CH); 137,6 (CH); 138,9 (C); 143,6 (C); 149,2 (C); 150,3 (C) ppm. IR (KBr): 2904 (s), 2845 (s), 1653 (s), 1603 (s), 1497 (s), 1446 (s), 1392 (m), 1345 (w), 1270 (w), 1210 (w), 777 (m), 697 (w), 614 (m) cm⁻¹. ESI-MS m/z (%): 741,4 [2·M+Na]⁺ (9), 719,3 [2·M+H]⁺ (3), 382,1 [M+Na]⁺ (9), 360,2 [M+H]⁺ (100).

(C₂₂H₂₅N₅) vyp. složení: 73,51 % C; 7,01 % H; 19,48 % N

exp. složení: 73,14 % C; 6,95 % H; 19,21 % N

6.1.2 Reakce s 4-(1-adamantylmethyl)anilinem

Ve 25 cm³ baňce bylo v 10 cm³ propan-2-olu rozpuštěno 50 mg 6-chlor-9*H*-purinu (0,32 mmol) a 156 mg aminu **12** (0,65 mmol). Po 23 hodinách TLC indikovala úplnou

konverzi výchozí látky. Rozpouštědlo z reakční směsi bylo odpařeno na RVO a k surovému produktu bylo přidáno 5 cm³ methanolu. Surový produkt byl poté zfiltrován přes fritu a filtrační koláč byl promýván studeným propan-2-olem.

***N*-4-(1-adamantylmethyl)fenyl)-9*H*-purin-6-amin (22)**

Surový produkt byl získán ve výtěžku 251 mg. Titulní látka byla získána po krystalizaci v podobě světle žlutého krystalického prášku ve výtěžku 52 mg (73 %); $t_f = 299\text{--}303\text{ }^\circ\text{C}$.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,46 (m, 6H, (CH(Ad))); 1,54–1,65 (m, 6H, CH(Ad)); 1,92 (m, 3H, CH(Ad)); 2,35 (s, 2H, AdCH₂Ph); 7,13 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ph); 7,74 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, Ph); 8,59 (m, 2H, NC²HN+NC⁸HN); 10,81 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. IR (KBr): 3429 (w), 3125 (w), 2902 (s), 2848 (s), 1651 (s), 1604 (w), 1510 (s), 1434 (s), 1384 (s), 1315 (m), 1201 (s), 1129 (w), 856 (w), 605 (w) cm⁻¹. ESI-MS $m/z(\%)$: 741,4 [2·M+Na]⁺ (7), 719,2 [2·M+H]⁺ (3), 382,1 [M+Na]⁺ (11), 360,2 [M+H]⁺ (100).

(C₂₂H₂₅N₅) vyp. složení: 73,51 % C; 7,01 % H; 19,48 % N
exp. složení: 73,01 % C; 7,12 % H; 19,75 % N

6.2 Reakce 2,6-dichlor-9*H*-purinu s aromatickými adamantylem substituovanými aminy

6.2.1 Reakce s 3-(1-adamantylmethyl)anilinem

V 50 cm³ baňce bylo v 7 cm³ propan-2-olu rozpuštěno 100 mg 2,6-dichlor-9*H*-purinu (27; 0,53 mmol) a 253 mg aminu 11 (1,05 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 80 °C po dobu 10 hodin. Pomocí TLC byla po této době indikována konverze veškeré výchozí látky. Z reakční směsi bylo na RVO odpařeno rozpouštědlo, surový produkt byl poté zfiltrován přes fritu. Matečný louh byl odpařen a následně purifikován sloupcovou chromatografií.

2-Chlor-*N*-(3-(1-adamantylmethyl)fenyl)-9*H*-purin-6-amin (23)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 323 mg. Titulní látka byla získána po filtraci v přítomnosti CHCl₃ a sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 12/1, v/v) v podobě žlutého krystalického prášku ve výtěžku 97 mg (58 %); $t_f = 256\text{--}259\text{ }^\circ\text{C}$.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,49 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,54 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,91 (m, 3H, CH(Ad)); 2,33 (s, 2H, AdCH₂Ph); 6,81 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, Ph); 7,22 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz,

Ph); 7,61 (m, 2H, Ph); 8,28 (s, 1H, NC⁸HN); 10,06 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 26,0 (C); 28,6 (CH); 37,0 (CH₂); 42,4 (CH₂); 51,1 (CH₂); 62,5 (C); 119,2 (C); 123,9 (CH); 126,1 (CH); 128,0 (CH); 138,4 (CH); 138,5 (C); 142,1 (C); 151,5 (C); 152,7 (C) ppm. IR (KBr): 3100 (w), 2903 (s), 2846 (s), 1637 (s), 1625 (s), 1577 (s), 1492 (s), 1425 (w), 1648 (m), 1317 (m), 1251 (m), 1179 (w), 1102 (w), 956 (m), 791 (w), 698 (w), 631 (w) cm⁻¹. ESI-MS *m/z*(%): 809,3 [2·(³⁵Cl)M+Na]⁺ (10), 432,1 [(³⁵Cl)M+K]⁺ (15), 416,1 [(³⁵Cl)M+Na]⁺ (19), 394,1 [(³⁵Cl)M+H]⁺ (100).

(C₂₂H₂₄ClN₅) vyp. složení: 67,08 % C; 6,14 % H; 17,78 % N

exp. složení: 67,31 % C; 6,03 % H; 17,49 % N

6.2.2 Reakce s 4-(1-adamantylmethyl)anilinem

Reakce byla provedena dle obecného postupu, který je uveden v kapitole 6.2.1 z výchozích navážek: purin **27** (80 mg; 0,42 mmol), amin **12** (167 mg; 0,85 mmol).

2-Chlor-*N*-(4-(1-adamantylmethyl)fenyl)-9*H*-purin-6-amin (**24**)

Surový produkt byl získán ve výtěžku 341 mg. Titulní látka byla získána po filtraci za přítomnosti CHCl₃ a sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 12/1, v/v) v podobě žlutého krystalického prášku ve výtěžku 121 mg (58 %); *t*_t = 294–297 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1,44 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,53 (m, 6H, CH₂(Ad)); 1,90 (m, 3H, CH(Ad)); 2,32 (s, 2H, AdCH₂Ph); 7,01 (m, 2H, Ph); 7,07 (m, 2H, Ph); 8,36 (s, 1H, NC⁸HN); 10,19 (s, 1H, C⁶NHPh) ppm. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 26,0 (C); 28,6 (CH); 37,0 (CH₂); 42,3 (CH₂); 50,3 (CH₂); 62,5 (C); 120,5 (C); 130,9 (CH); 133,2 (CH); 137,2 (C); 141,4 (C); 151,8 (C); 152,8 (C) ppm. IR (KBr): 3107 (w), 2902 (s), 2844 (m), 1624 (s), 1594 (s), 1509 (s), 1466 (w), 1349 (m), 1315 (m), 1231 (m), 1155 (w), 965 (m), 808 (w), 606 (w) cm⁻¹. ESI-MS *m/z*(%): 809,3 [2·(³⁵Cl)M+Na]⁺ (12), 432,1 [(³⁵Cl)M+K]⁺ (22), 416,1 [(³⁵Cl)M+Na]⁺ (40), 394,1 [(³⁵Cl)M+H]⁺ (100).

(C₂₂H₂₄ClN₅) vyp. složení: 67,08 % C; 6,14 % H; 17,78 % N

exp. složení: 67,32 % C; 6,10 % H; 17,11 % N

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

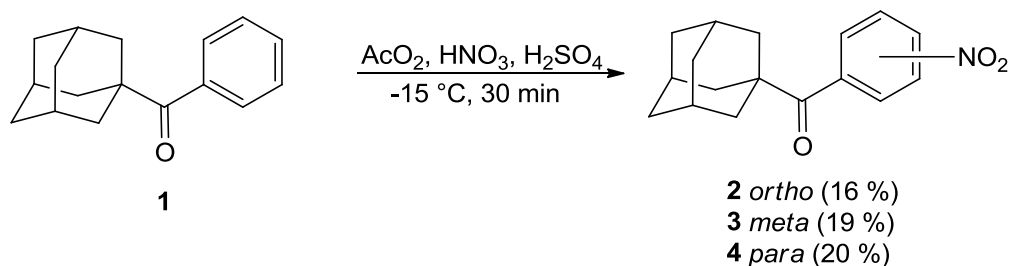
7 PŘÍPRAVA 1-ADAMANTYLEM SUBSTITUOVANÝCH AROMATICKÝCH AMINŮ

V této kapitole bude popsána jak série syntéz, která vedla k přípravě aromatických aminů nesoucích adamantylový skelet, tak i nezdařené reakce s příslušným komentářem.

7.1 Nitrace adamantyl(fenyl)methanonu

Acetanhydrid byl pipetován do reaktoru, který byl vychlazen kryostatem na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Požadované nitroketony (látky **3** a **4**, Schéma 16) byly syntetizovány pomocí připravené nitrační směsi, která byla opatrně dávkována do reaktoru. S každou kapkou nitrační směsi stoupala i teplota v reaktoru, tudíž byla vyžadována vysoká opatrnost při dávkování. Po přidání poloviny nitrační směsi byl pozorován teplotní skok z $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po nadávkování nitrační směsi byla opatrně dávkována výchozí látka rozpuštěná v acetanhydridu. Po 30 minutách od přidání poslední kapky byla podle TLC detekována plná konverze výchozí látky. Reakční směs byla extrahována diethyletherem (DEE), organická fáze byla vysušena a odpařena na RVO. Analýzou GC-MS surového produktu bylo zjištěno, že obsahuje všechny tři možné regioisomery, tedy *ortho*-, *meta*- a *para*-, přičemž jejich zastoupení v surovém produktu činilo, dle GC-MS, 16, 19 a 20 %. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 8/1, v/v), přičemž byly vyizolovány látky **2** (16 %), **3** (19 %) a **4** (20 %).

Schéma 16

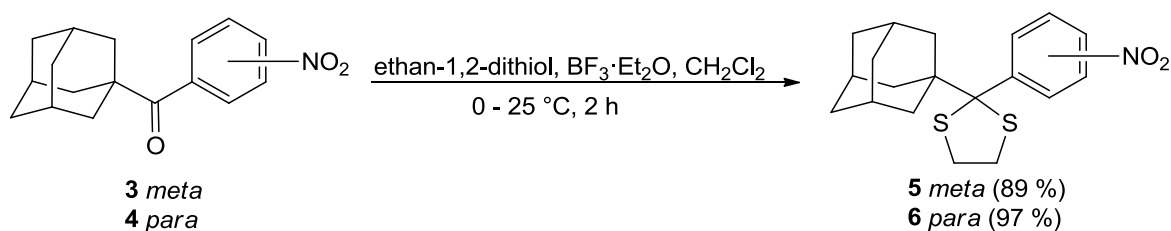


Nutno podotknout, že pro potřeby této diplomové práce bylo dále pracováno pouze s ketony obsahujícími nitroskupinu v poloze *meta* (**3**) a *para* (**4**). To je také důvodem absence sloučeniny **2** nejen v experimentální části, ale také ve zbylé části rukopisu.

7.2 Reakce nitroketonů s ethan-1,2-dithiolem

Sloučeniny **3** a **4** byly následně použity k přípravě nitroketonů **5** a **6** nesoucích protektivní dithiolanovou skupinu (Schéma 17). K výchozí látce rozpuštěné v CH_2Cl_2 byl přidán ethan-1,2-dithiol a reakční směs byla míchána v ledové lázni po dobu 30 minut. Poté byl přidán etherát fluoridu boritého ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) a byla odstraněna ledová lázeň. Po 2 hodinách TLC indikovala konverzi veškeré výchozí látky. Reakční směs byla alkalizována hydroxidem sodným a promyta CH_2Cl_2 . Organická fáze byla vysušena uhlíčanem draselným a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Požadované nitrodithiolany **5** a **6** byly získány ve vysokých výtěžcích 89 % a 97 % v čistotě nevyžadující jakoukoliv následnou purifikaci. Struktura sloučenin **5** a **6** byla navržena pomocí běžně používaných instrumentálních metod (IR, MS a NMR).

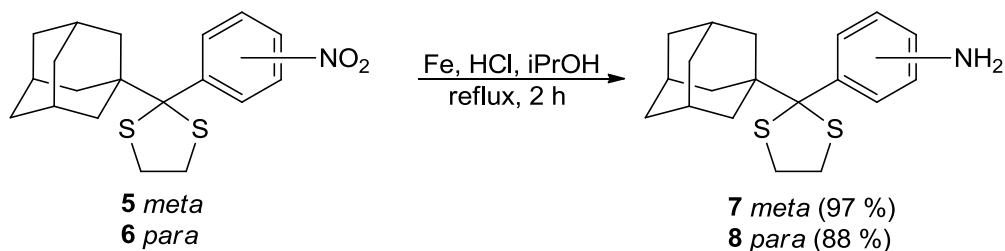
Schéma 17



7.3 Redukce nitrodithiolanů na aminodithiolany

Dalším krokem byla redukce nitroskupiny sloučenin **5** a **6** na aminoskupinu ilustrovaná na Schématu 18. Pro tyto účely bylo použito velmi jemné práškové železo, přičemž reakce probíhala v prostředí vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, 1/1, v/v). Po indikaci konverze výchozí látky pomocí TLC byla reakční směs zneutralizována vodným roztokem 10% hydroxidu sodného a vodná fáze následně opakovaně extrahována diethyletherem.

Schéma 18



Čistota a zároveň struktura získaných produktů byla primárně ověřena pomocí metody GC-MS. Na základě získaných chromatogramů, v nichž byl v obou případech pozorován pouze jediný pík, bylo usouzeno, že obě látky byly získány v odpovídající čistotě nevyžadující žádnou další purifikaci. V hmotnostních spektrech prvního řádu pak byl v obou případech pozorován signál o m/z 331 odpovídající hodnotě molekulového iontu (v podobě kation radikálu) požadovaných sloučenin. Základním píkem pak byl v obou případech ion o m/z 196 vznikající ztrátou 1-adamantylu v průběhu fragmentace molekulového iontu $[M^+ - C_{10}H_{15}]^+$. Struktura obou produktů byla následně potvrzena pomocí dalších technik, např. infračervené spektroskopie, 1H a ^{13}C NMR spektroskopie. Sloučeniny **7** a **8** byly získány ve výtěžcích 97 %, resp. 88 %.

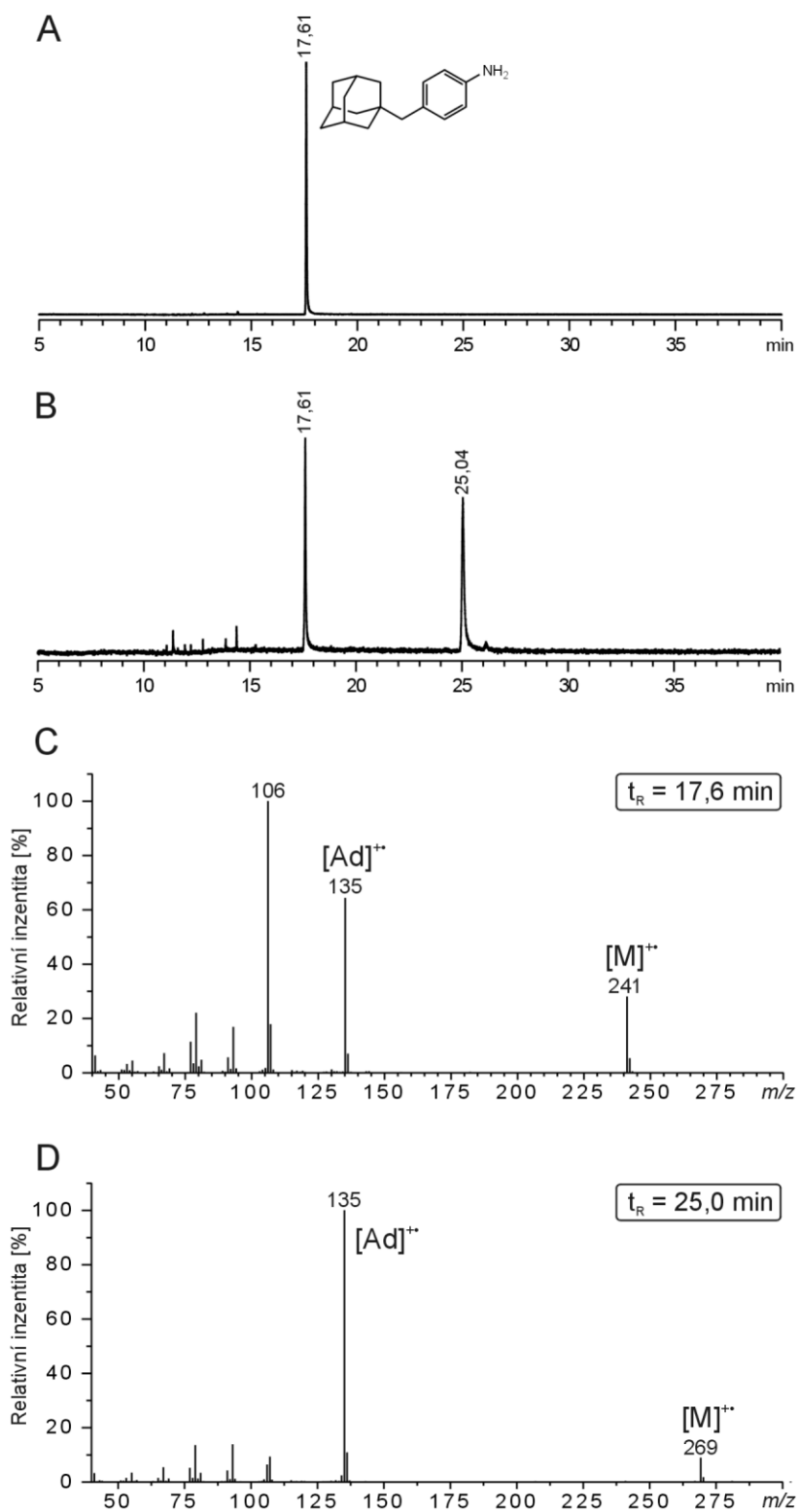
7.4 Mazingova redukce

Finální krok vedoucí k přípravě aminů, obsahujících mezi adamantanovým skeletem a benzenovým kruhem nepolární methylenový můstek, představovala Mazingova redukce. Principem této reakce je odstranění chránícího dithiolanového skeletu za vzniku odpovídajícího „alkanu“, přičemž k redukci se používá aktivovaný Raneyův nikl. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC a GC-MS.

První pokus o přípravu uvažovaných sloučenin se, poněkud překvapivě, nezdařil, a to i přesto, že po ukončení obou souběžně prováděných reakcí (redukce sloučenin **7** a **8**) byl v reakční směsi přítomen výhradně požadovaný amin **11** a **12**, což bylo jednoznačně ověřeno pomocí GC-MS analýzy. Chromatogram získaný GC-MS analýzou reakční směsi redukce aminu **8** je znázorněn na **Obrázku 10A**.

Jak se posléze ukázalo, klíčové „pochybení“ spočívalo ve volbě rozpouštědla (diethylether) použitého k extrakci produktu z reakční směsi a ponechání spojených etherových podílů nad síranem sodným po dobu 72 hodin. GC-MS analýza surového produktu Mazingovy redukce aminu **8** totiž indikovala, že je v této směsi obsažena ještě jedna sloučenina. Právě když k původnímu solitérnímu píku s retenčním časem 17,6 minuty, přibyl další, s retenčním časem 25,0 minuty. V tomto okamžiku obsahoval surový produkt 41 % požadované látky a 59 % neznámé nečistoty (**Obrázek 10B**). Stejný výsledek byl pozorován také při analýze surového produktu získaného redukcí aminu **7** s tím, že k požadovanému produktu s retenčním časem 17,5 minuty přibyl pík s retenčním časem 23,7 minuty. Poté, co byla vyloučena možnost kontaminace GC-MS, započala snaha

o separaci jednotlivých sloučenin a dále o identifikaci a vysvětlení původu nežádoucích látek, k jejichž tvorbě během oněch tří dnů došlo.

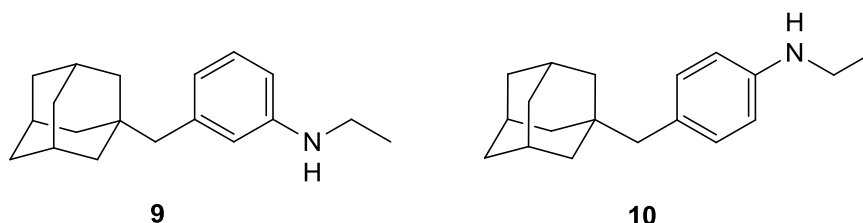


Obrázek 10: GC-MS průběhu Mozingovy redukce látky **8** (A, B) a hmotnostní spektra vznikajících sloučenin (C, D).

I přes opakované pokusy přečistit surové produkty pomocí sloupcové chromatografie za použití různých mobilních fází, se nepodařilo jednotlivé komponenty od sebe oddělit. Navíc, ačkoliv výsledky GC-MS analýz naznačovaly, že se ve směsi nachází pouze dvě chemická individua, z výsledků získaných TLC analýzami bylo zřejmé, že se jedná o podstatně komplikovanější směs látek. Z výše uvedeného je zřejmé, že se nepodařilo izolovat ani požadovaný produkt, ani sloučeninu pozorovanou pomocí metody GC-MS s retenčním časem 25,0 (redukce aminu **8**) resp. 23,7 minuty (redukce aminu **7**).

Přes tento neúspěch bylo stále jednoznačným cílem pokusit se navrhnout strukturu dodatečně vznikajících vedlejších látek. Jedinou možností tak představovaly výsledky získané pomocí hmotnostní spektrometrie. V případě obou reakcí byl ve spektrech prvního řádu pozorován molekulový ion o m/z 269, tedy o 28 m/z vyšší než je hmotnost požadovaného aminu (m/z 241). Základním píkem byl v obou případech ion o m/z 135 odpovídající kationradikálu adamantylového skeletu, z čehož vyplývá, že se jedná o látku obsahující tento polycyklický uhlovodík. S ohledem na skutečnost, že hmotnost molekulového iontu je lichá (269 m/z), lze se domnívat, že se v molekule nachází lichý počet atomů dusíku, velmi pravděpodobně jeden. Hmotnostní spektrum vedlejšího produktu vznikajícího při redukcí aminu **8** je znázorněno na **Obrázku 10D**. Pro snadnější přehlednost a možnost srovnání, je na **Obrázku 10C** znázorněno hmotnostní spektrum požadovaného aminu **12**.

Jak je výše uvedeno, hmotnost „nově“ vznikající látky je, ve srovnání s požadovaným produktem, větší o 28 m/z . Na základě těchto skutečností by nežádoucím vedlejším produktem mohl být sekundární amin obsahující na atomu dusíku ethylový substituent. Návrh struktury obou možných vedlejších produktů je znázorněn na **Obrázku 11**.



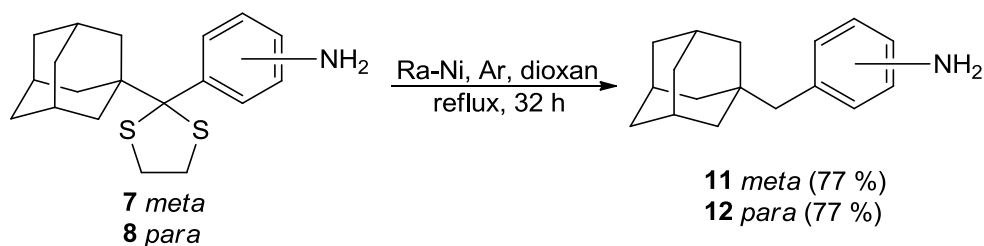
Obrázek 11: Pravděpodobné vedlejší produkty Mozingovy redukce.

S ohledem na výše uvedené a na skutečnost, že při těchto reakcích bylo „zmařeno“ veškeré množství *meta*- a *para*-aminodithiolanů **7** a **8**, bylo nezbytné zopakovat celou sérii reakcí vedoucích k požadovaným aromatickým adamantylem substituovaným aminům **11**

a **12**, tedy reakce uvedené v kapitolách 7.1 až 7.3. Na druhý pokus se již povedlo syntetizovat požadované látky v množství potřebném k dalším syntézám.

Opětovně prováděná Mozingova redukce byla pro jistotu provedena na dvakrát s polovičním množstvím výchozí látky, přičemž při zpracování reakční směsi byl namísto diethyletheru použit dichlormethan, ve kterém je produkt dobře rozpustný. Celkový výtěžek ze zmíněných dvou reakcí činil shodně 77 % (**Schéma 19**).

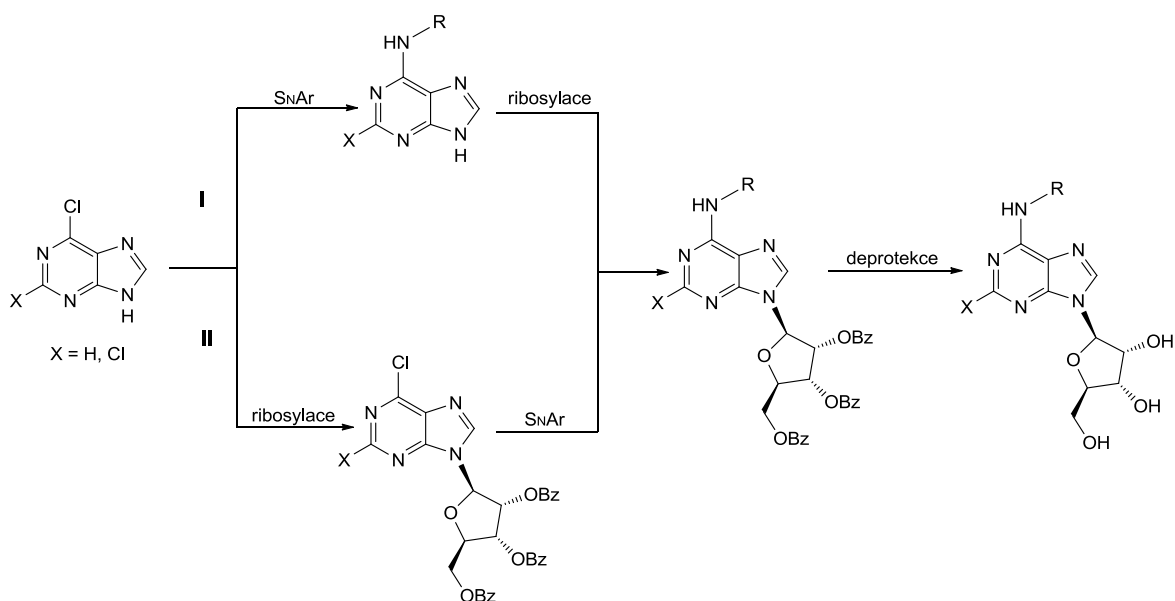
Schéma 19



8 PŘÍPRAVA MODELOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ

Na tomto místě se jeví jako vhodné nastínit zamýšlenou syntetickou strategii. Jak vyplývá ze **Schématu 20**, k uvažovaným sloučeninám teoreticky vedly dvě odlišné cesty. První cesta spočívá v ribosylaci purinu **14**, následovanou substitucí atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu a zakončenou odstraněním chránících skupin. Ve druhé cestě je naopak nejprve substituován atom chloru na C6 příslušným aminem, následně je do polohy 9 purinového kruhu zavedena chráněná ribóza a na závěr je opět provedena deprotektce. V následujících kapitolách budou komentovány jednotlivé reakce vedoucí k syntéze uvažovaného typu sloučenin s tím, že jako modelový substituent (primární aromatický amin) byl použit anilin.

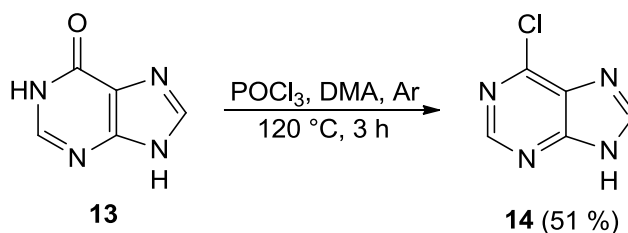
Schéma 20



8.1 Příprava 6-chlor-9H-purinu

Sloučenina **14** byla syntetizována podle dříve publikovaného postupu³⁵ za podmínek uvedených ve **Schématu 21**, a to přesto, že se jedná o látku komerčně dostupnou. Výchozí látkou byl hypoxanthin (**13**), který byl rozpuštěn v dimethylanilinu (DMA). Po rozpuštění byl přikapáván trichlorid fosforylu (POCl_3). Reakční směs byla refluxována po dobu 3 hodin pod ochrannou argonovou atmosférou. Po ukončení reakce byla reakční směs nalita na ledovou tříšť a míchána do plného rozpuštění ledu. Surový produkt byl rozpuštěn v horkém CH_3CN , zfiltrován a odpařen na RVO. Výtěžek reakce činil 51 % (**14**).

Schéma 21



Struktura požadovaného produktu byla navržena na základě výsledků získaných pomocí spektrálních technik, např. NMR, IR a MS. V hmotnostním spektru získaného metodou GC-EI-MS byl jako základní pík (a zároveň také molekulový ion) pozorován signál o m/z 154, který byl doprovázený signálem o m/z 156, kdy vzájemný poměr těchto dvou signálů byl 3:1, což odpovídá vzájemnému poměru izotopů ³⁵Cl a ³⁷Cl. Lze tedy s určitostí říci, že byl připraven požadovaný purin **14**, který sloužil jako výchozí látka pro všechny následující reakce, jejichž cílem bylo připravit sérii purinových ribonukleosidů s adamantanovým skeletem s doposud nepopsanou strukturou.

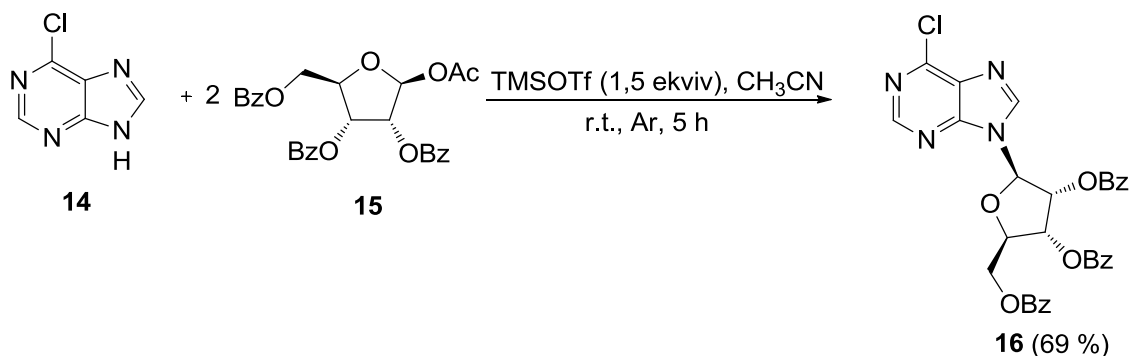
8.2 Syntetická cesta I

8.2.1 Ribosylace 6-chlor-9H-purinu

Ribosylace purinu **14** byla provedena dvěma metodami s cílem zjistit, kterou z nich bude získán požadovaný produkt ve vyšším výtěžku.

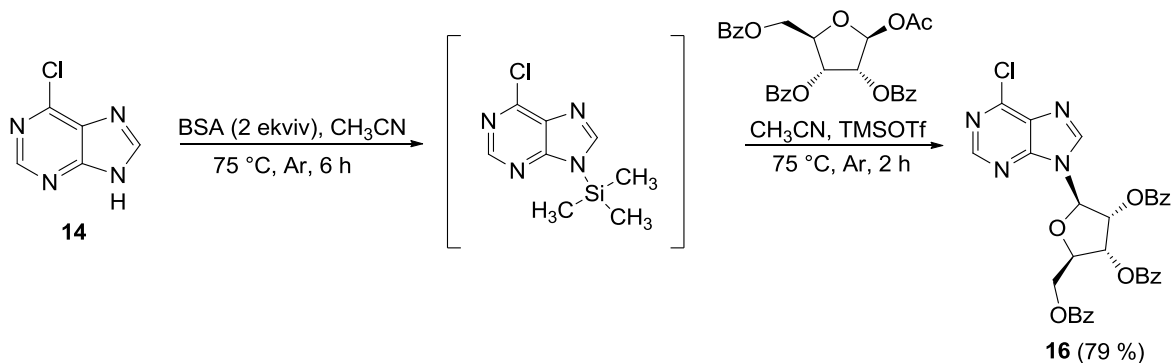
V případě „metody A“ byla sloučenina **14** a dvou molární přebytek chráněné ribózy společně rozsuspendovány v CH₃CN. Poté byl do reakční směsi přidán TMSOTf, přičemž došlo k úplnému rozpuštění obou reaktantů. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod ochrannou argonovou atmosférou (**Schéma 22**). Po 5 hodinách indikovala TLC úplnou konverzi výchozí látky. Získaný surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií, což vedlo k izolaci požadovaného produktu v uspokojivém výtěžku 69 %.

Schéma 22



Podle dříve publikovaného postupu³⁶ (metoda B, **Schéma 23**) byl výchozí purin **14** rozsuspendován v CH₃CN. Vzniklá suspenze se rozpustila po přidání silylačního činidla (BSA). Reakční směs byla míchána po dobu 6 hodin při teplotě 75 °C. Po této době byla do reakční směsi injekční jehlou přidána chráněná ribóza rozpuštěná v CH₃CN a TMSOTf. Po dvou hodinách indikovala TLC analýza spotřebování obou výchozích látek. Po přečištění surového produktu pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) byla požadovaná sloučenina **16** získána ve velmi dobrém výtěžku 79 %.

Schéma 23



Struktura sloučeniny **16**, získané pomocí metody A a metody B, byla potvrzena na sobě nezávislými analýzami. V případě obou látek se jednalo o IR, NMR a MS. V ¹H NMR spektru sloučeniny **16** byla, ve srovnání s výchozí látkou (purin **14**), pozorována řada nových signálů. V oblasti 4,71–4,83 ppm byly pozorovány signály dvou atomů vodíku pocházejících z methylenového můstku spojujícího benzylovou chránicí skupinu s pětičlenným furanovým kruhem. Dále byly v oblasti 4,92–6,73 ppm pozorovány signály odpovídající čtyřem atomům vodíku z furanového skeletu. V neposlední řadě bylo v protonovém spektru pozorováno celkem 15 atomů vodíku nacházejících se v „aromatické oblasti“, a sice 7,49–7,97 ppm. Tyto atomy vodíku pocházejí z fenyľů, které jsou součástí

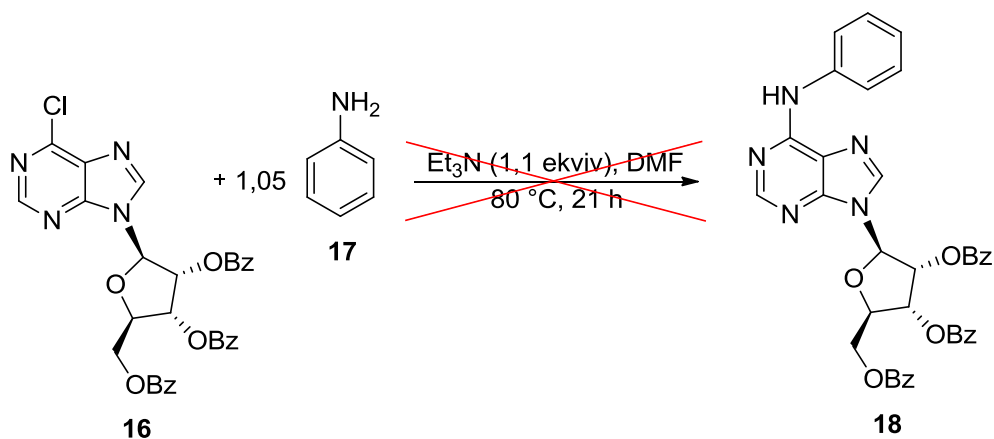
benzoylových chránících skupin. Za zmínku stojí také uvést, že v protonovém spektru nebyl pozorován signál atomu vodíku N⁹H z purinového skeletu, což podporuje předpoklad ribosylace do polohy N9. V hmotnostním spektru prvního řádu získaného technikou ESI-MS byl jako dominantní signál pozorován ion o m/z 621 odpovídající sodnému aduktu sloučeniny **16**. Tento signál byl doprovázen dalšími dvěma ionty o hodnotě 599 m/z $[M+H]^+$ a 637 m/z $[M+K]^+$. Ve spektru prvního řádu byly rovněž pozorovány dva signály vyšších asociátů, a sice ion o m/z 1197 $[2\cdot M+H]^+$ a 1219 $[2\cdot M+Na]^+$. V souladu se skutečností, že je v molekule purinu **16** obsažen atom chloru, byly v molekulovém klastru protonované molekuly, sodného a draselného aduktu pozorovány signály větší o 2 m/z než monoizotopický ion, a to v přibližném poměru 3:1 vůči monoizotopickému iontu. Tyto signály odpovídají izotopu ³⁷Cl. Podobně tomu bylo i v případě vyšších asociátů s tím rozdílem, že podobě molekulového klastru odpovídala přítomnosti dvou atomů chloru.

8.2.2 Reakce sloučeniny **16** s anilinem

Optimalizace reakčních podmínek nukleofilní aromatické substituce

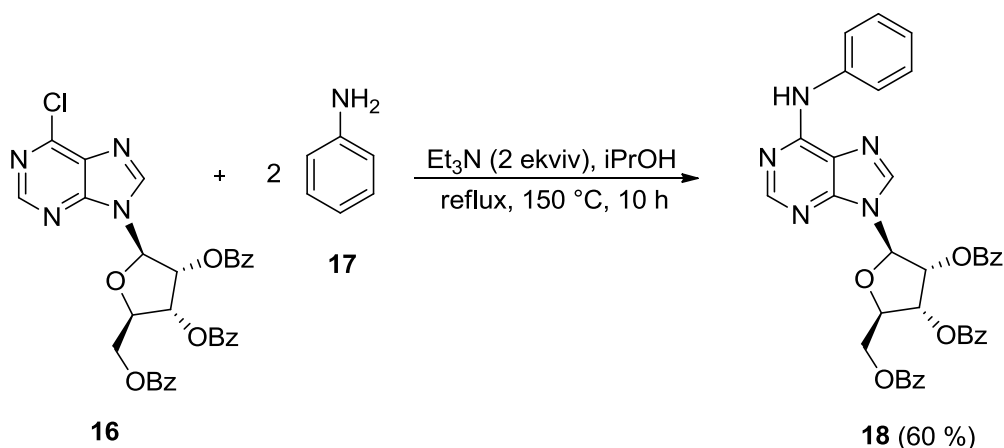
Jako první byla provedena reakce s 1,05 molárním přebytkem anilinu a 1,1 molárním přebytkem triethylaminu, který zde plní funkci báze. Jako rozpouštědlo byl zvolen dimethylformamid (DMF). Reakční směs byla refluxována při teplotě 80 °C, ale ani po 21 hodinách nebyly pozorovány (dle provedených TLC analýz) žádné známky tvorby jakéhokoliv produktu (**Schéma 24**). Důvodem mohla být nesprávná volba reakčních podmínek (malý přebytek aminu či báze, rozpouštědlo apod.).

Schéma 24



Po neúspěchu syntetizovat sloučeninu **18** výše uvedeným způsobem, bylo zvoleno jiné rozpouštědlo, a sice propan-2-ol. Dále bylo přikročeno ke zvýšení množství anilinu a triethylaminu v reakční směsi na dvou molární přebytek a zvýšení teploty reakce na 150 °C (**Schéma 25**). Změna reakčních podmínek se projevila už po dvou hodinách, kdy byla provedena první monitorovací TLC analýza, přičemž na vyvinuté TLC vrstvě byla pozorována (vyjma výchozího purinu a anilinu) přítomnost jedné nové látky. Konverze veškeré výchozí látky (purinu **16**) byla indikována po 10 hodinách. Následně byla reakční směs odpařena na RVO a surový produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií. Přečištěný produkt **18** byl izolován v dobrém výtěžku 60 %.

Schéma 25

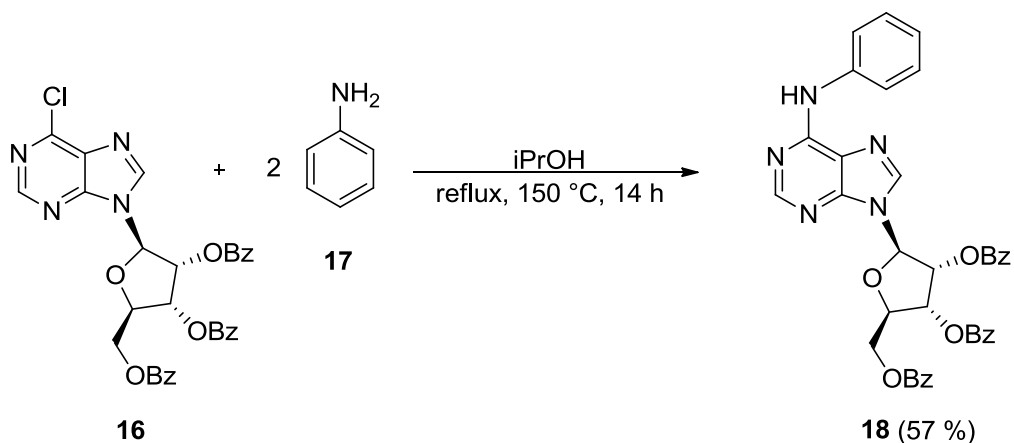


Syntéza sloučeniny **18** byla následně úspěšně provedena ještě jednou, tentokrát za vyloučení báze. Reakce opět probíhala v propan-2-olu při teplotě 150 °C. Výtěžek reakce činil, po purifikaci surového produktu sloupcovou chromatografií, 57 %, tudíž absence báze nejen, že nevedla k vyššímu výtěžku, ale navíc měla pravděpodobně za následek prodloužení doby reakce o 3 hodiny na konečných 14 hodin (**Schéma 26**).

Struktura sloučeniny **18** byla potvrzena pomocí běžných spektrálních metod. V ¹H NMR spektru byly, ve srovnání se spektrem sloučeniny **16**, pozorovány nové signály v aromatické oblasti pocházející z fenylového kruhu aromatického aminu substituovaného v poloze 6 purinového kruhu a dále pak singlet v oblasti 9,97 ppm odpovídající atomu vodíku sekundárního aminu spojujícího purinový a fenylový skelet (C⁶NHPh). V ESI-MS spektru prvního řádu změřeného v kladném skenovacím módu byly pozorovány tři signály. Hodnota iontu s nejvyšší intenzitou činila 656 *m/z*, což odpovídá protonované molekule

purinu **18**. Tento signál byl doprovázen sodným ($678\ m/z$) a draselným ($694\ m/z$) aduktem sloučeniny **18**.

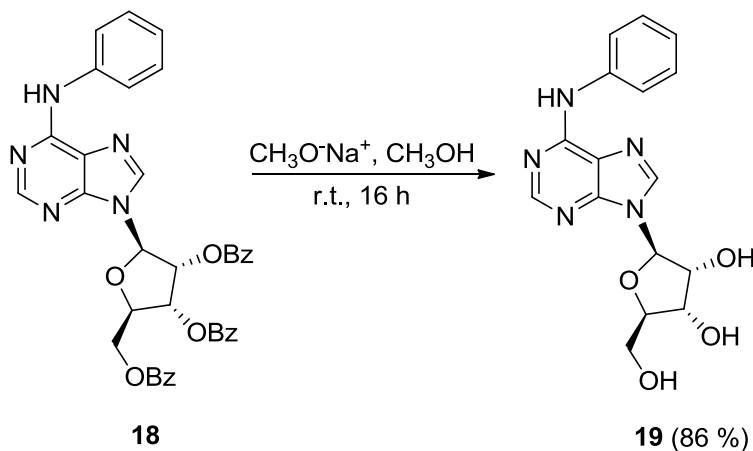
Schéma 26



8.2.3 Deprotekce sloučeniny **18**

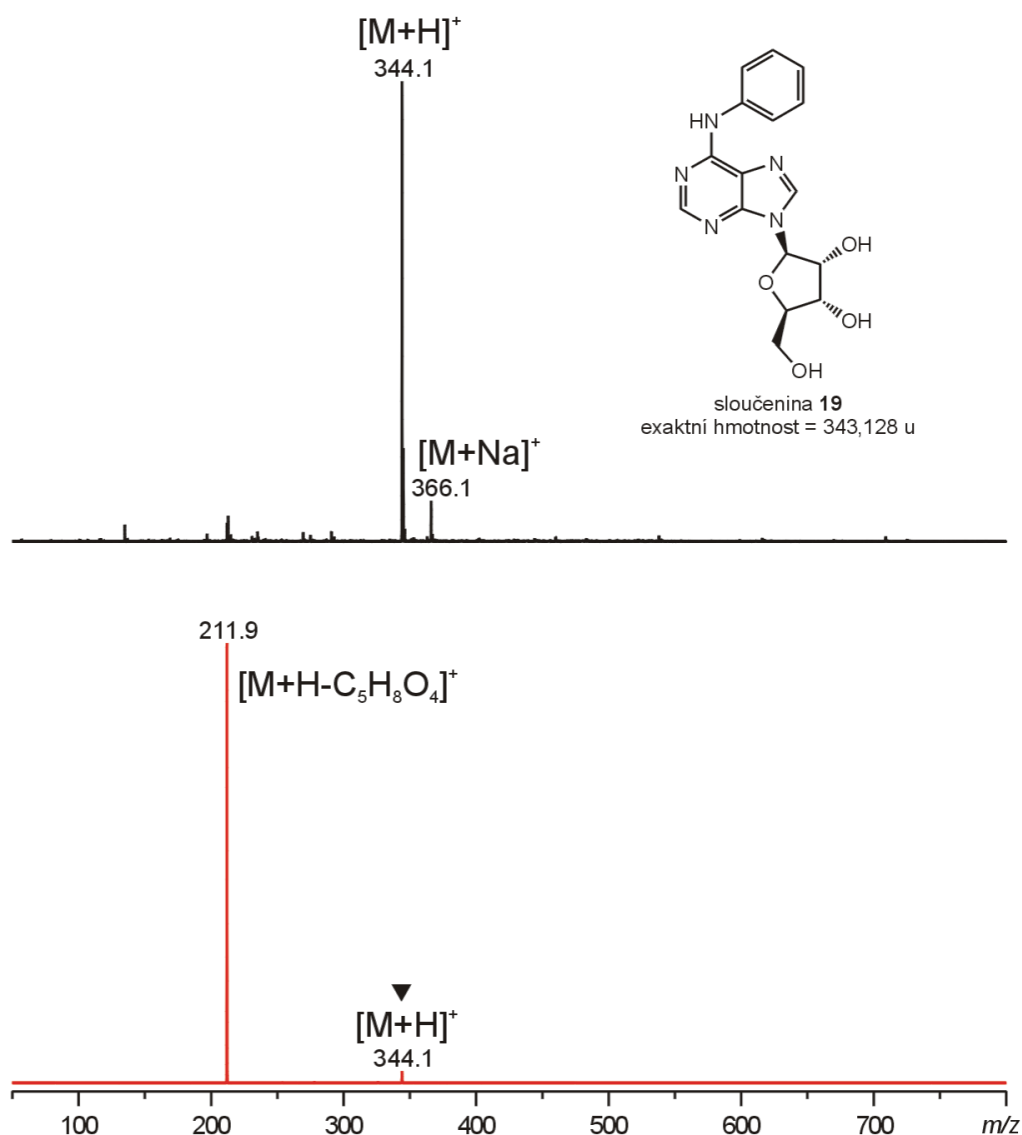
Nejčastěji využívaným způsobem deprotekce, neboli odstranění chránících skupin (v tomto případě benzoylových), je použití methanolátu sodného v prostředí bezvodého methanolu při laboratorní teplotě (Schéma 27)³⁷. V případě deprotekce sloučeniny **18** trvala reakce 16 hodin (monitorováno pomocí TLC). Po zpracování reakční směsi a odpaření organických podílů za vakua, byl získaný surový produkt přečištěn sloupcovou chromatografií. Titulní látka **19** byla izolována ve vysokém výtěžku 86 %.

Schéma 27



Tak jako u všech shora uvedených látek, také struktura purinu **19** byla potvrzena pomocí metod strukturní analýzy. Deprotekce benzoylových skupin se v protonovém NMR spektru projevila absencí atomů vodíku v aromatické oblasti (vyjma atomů vodíku pocházejících

z aromatického aminu na C6). Signály atomů vodíku hydroxylových skupin cukerné jednotky byly pozorovány v oblasti 5,22 až 5,97 ppm. V hmotnostním spektru prvního řádu sloučeniny **19** získaného technikou ESI-MS byly pozorovány dva signály, a sice jednou nabitý ion o m/z 344 odpovídající protonované molekule a dále ion o m/z 366, který odpovídá sodnému aduktu sloučeniny **19** (Obrázek 12, nahoře). Izolací a následnou fragmentací $[M+H]^+$ iontu (m/z 366) za podmínek kolizí indukované disociace, byl pozorován pouze ion o m/z 212 značící neutrální ztrátu fragmentu o m/z 132 odpovídající deprotonované ribofuranosylové jednotce (Obrázek 12, dole).



Obrázek 12: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **19** (nahoře) a MS/MS spektrum iontu o m/z 344 (dole).

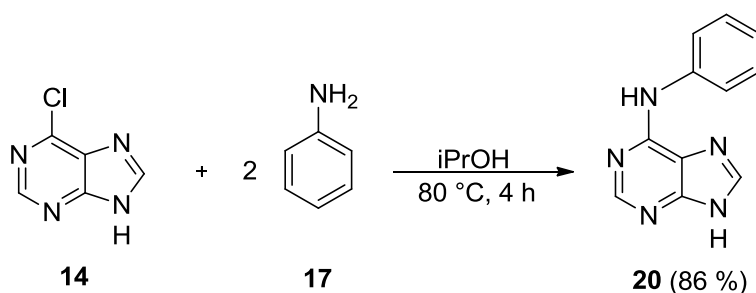
8.3 Syntetická cesta II

Druhým způsobem jak docílit přípravy modelové látky **18** bylo zavedení aromatického aminu do polohy C6 purinového kruhu a následná ribosylace již substituovaného purinu (Schéma 20).

8.3.1 Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru

Reakční podmínky pro substituci atomu chloru v poloze 6 sloučeniny **14** primárním aromatickým aminem byly zvoleny na základě předchozích zkušeností s tímto typem syntézy (Schéma 28). Sloučenina **14** byla rozpuštěna při teplotě 80 °C v propan-2-olu. Následně byl přidán anilin v dvoumolárním přebytku a reakční směs byla dále míchána při teplotě 80 °C. Konverze veškeré výchozí látky **14** byla pozorována již po 4 hodinách (monitorováno pomocí TLC). Vysrážené pevné podíly byly zfiltrány a filtrační koláč byl promyt CHCl₃. Požadovaná sloučenina **20** byla získána ve velmi dobrém výtěžku 86 %.

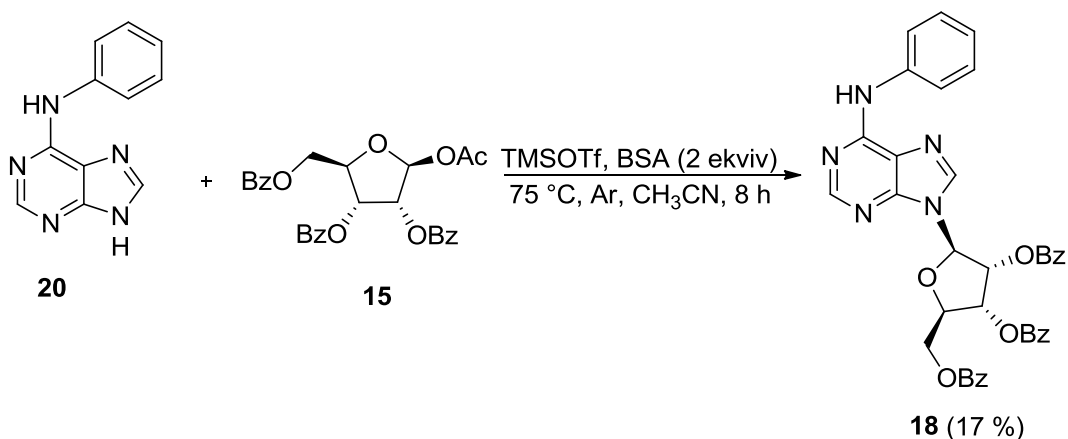
Schéma 28



8.3.2 Ribosylace *N*-fenyl-9*H*-purin-6-aminu

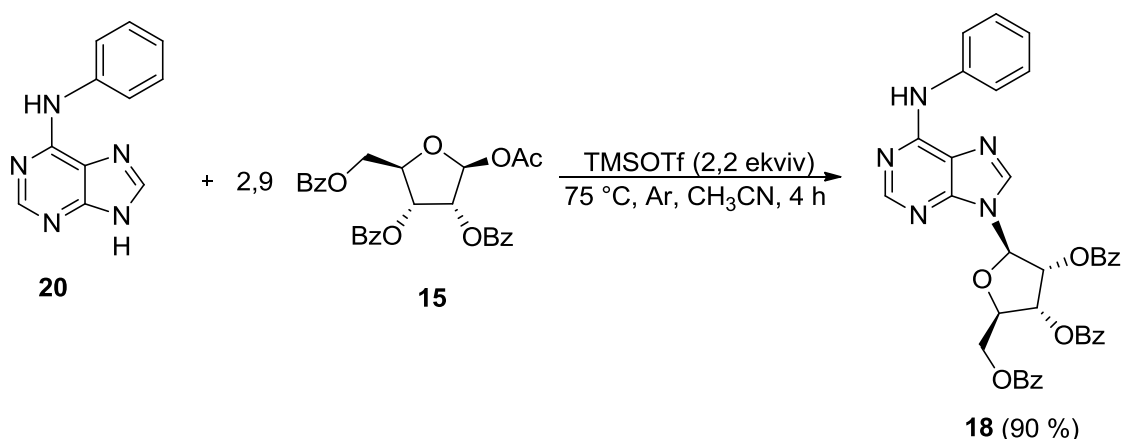
Jako první byla provedena reakce za přítomnosti silylačního činidla BSA, které bylo do reakční směsi přidáno po rozsuspendování sloučeniny **14**. Vzniklý roztok byl míchán po dobu 6 hodin, aby došlo k plné silylaci atomu dusíku N9. Po této době byla přidána sloučenina **15** a následovalo přidání TMSOTf. Po dalších 2 hodinách byla reakční směs zpracována přidáním destilované vody a extrakcí ethyl-acetátem. Voda se k reakční směsi přidává, aby došlo k rozložení činidel BSA a TMSOTf, která jsou na vodu a vlhkost všeobecně velmi citlivá. Purifikací sloupcovou chromatografií byla získána požadovaná sloučenina **19** ve velmi nízkém výtěžku 17 % (Schéma 29).

Schéma 29



S cílem zvýšit výtěžek byl následně proveden druhý pokus o zavedení chráněné ribózy do polohy 9 purinového kruhu. V tomto případě byl 2,9 molární přebytek sloučeniny **20**, spolu s chráněnou ribózou, rozpuštěn v CH_3CN . Poté byl do vzniklého roztoku přidán 2,2 molární přebytek TMSOTf. Reakční směs byla míchána pod ochrannou argonovou atmosférou při laboratorní teplotě po dobu 4 hodin, po kterých byla pomocí TLC indikována plná konverze výchozí látky. Po přidání destilované vody byla reakční směs extrahována ethyl-acetátem, spojené organické podíly byly vysušeny a poté odpařeny na RVO. Surový produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií. Sloučenina **18** byla při použití výše uvedených podmínek získána ve výtěžku 90 %. (**Schéma 30**).

Schéma 30



Struktura sloučeniny **18** byla potvrzena pomocí běžně používaných metod s tím, že získané výsledky byly ve shodě s daty komentovanými v kapitole 8.2.2.

9 PŘÍPRAVA NOVÝCH DERIVÁTŮ PURINU

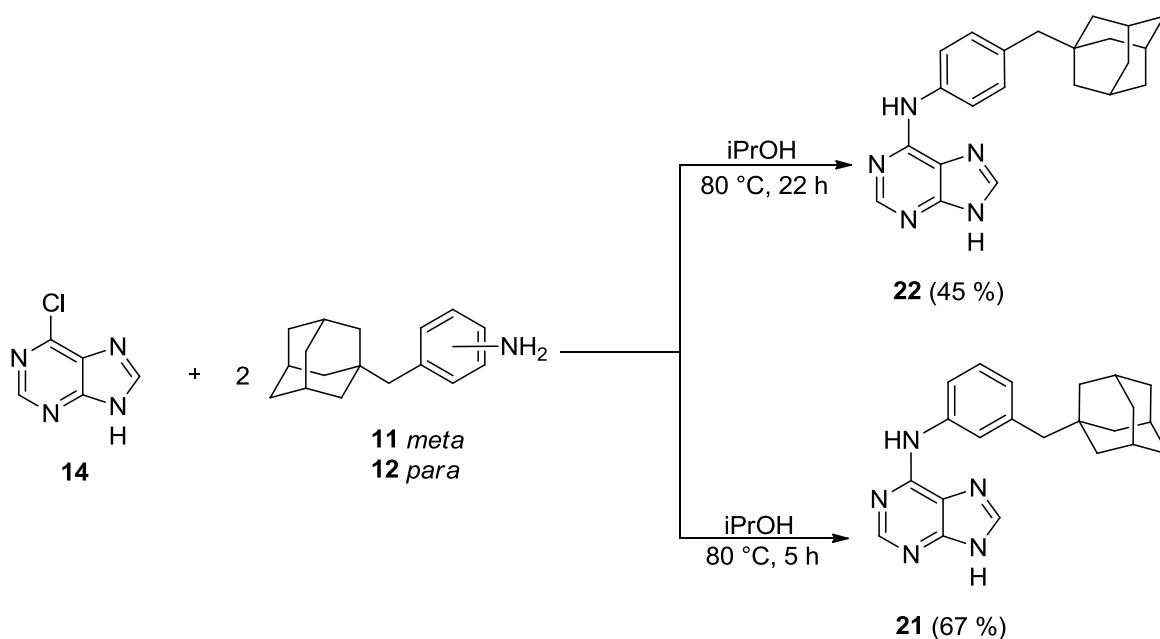
Po provedení reakcí uvedených v kapitolách 8.2 a 8.3, byly výsledky získané pomocí syntetické cesty **I** a **II** vzájemně porovnány a vyhodnoceny. Na základě získaných dat bylo rozhodnuto postupovat při syntéze purinových ribonukleosidů obsahujících adamantanový skelet cestou **II**. Důvodem tohoto rozhodnutí byla nejen výše výtěžků sloučenin **16**, **18** a **20** získaných pomocí jednotlivých cest, ale také časová a ekonomická náročnost jednotlivých reakcí.

9.1 Reakce 6-chlor-9H-purinu s nepolárními aminy

Na základě výše uvedeného byla nejprve provedena série nukleofilních aromatických substitucí atomu chloru na C6 sloučeniny **14** a **27** s cílem nahradit tento atom aromatickými aminy nesoucími 1-adamantyl (látky **11** a **12**), jejichž syntéza je blíže komentovaná v předchozích kapitolách této práce.

Nejprve byla provedena substituce atomu chloru sloučeniny **14**, kdy reakce byla prováděna v propan-2-olu při teplotě 80 °C, přičemž příslušný amin byl použit v dvoumolárním přebytku (**Schéma 31**).

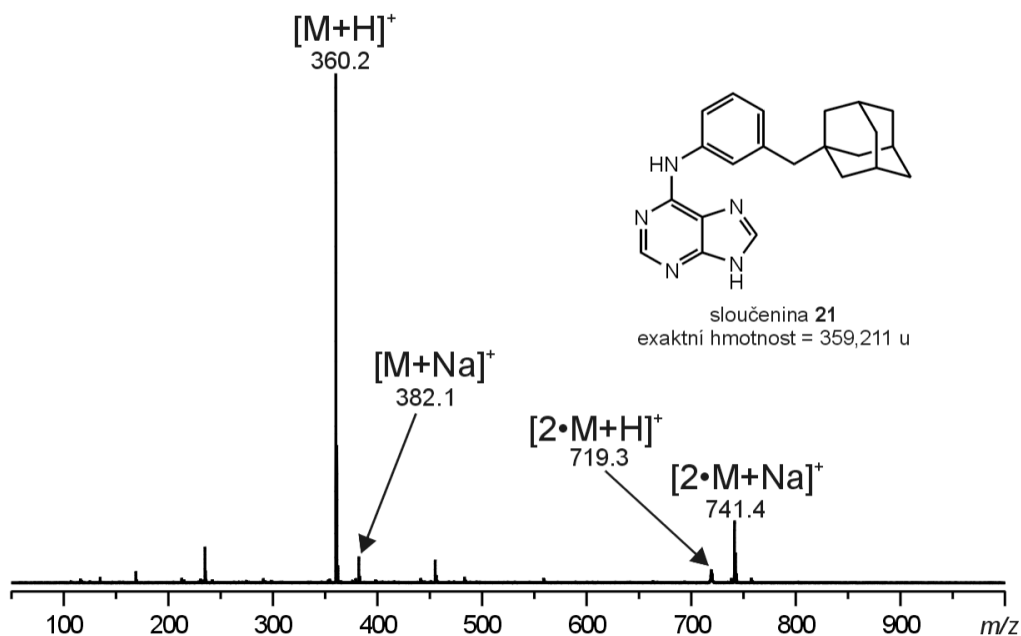
Schéma 31



Zatímco zavedení *meta* substituovaného aminu **11** proběhlo za 5 hodin, reakce s *para* substituovaným aminem **12** trvala více než 4krát tak déle (22 hodin). Po ukončení obou

reakcí (průběh monitorován pomocí TLC) a vytemperování reakčních směsí na laboratorní teplotu byl v obou případech pozorován vznik sraženiny, která byla následně odfiltrována a promyta ledovým propan-2-olem. Matečný louh byl následně purifikován sloupcovou chromatografií. Tímto postupem byly získány látky **21** a **22** v uspokojivých výtěžcích 67 %, resp. 45 %.

Interpretací ^1H NMR spektra bylo docíleno potvrzení obou struktur látek **21** a **22**. Byly pozorovány chemické posuny v oblasti 1,48–1,91 ppm odpovídající výskytu atomů vodíku pocházejících z 1-adamantylu. Dále byl v protonovém spektru pozorován singlet s posunem v oblasti 2,37 ppm značící na přítomnost atomů vodíku z methylenového můstku mezi fenylovým kruhem a 1-adamantylem. Aromatická oblast spektra purinu **21** obsahovala 4 signály (dublet, triplet, multiplet a dublet) poukazující na přítomnost 4 různě stíněných atomů vodíku. V aromatické oblasti ^1H NMR spektra purinu **22** byly pozorovány 2 signály, které značí dva páry navzájem neekvivalentních atomů vodíku na benzenovém kruhu. Nejvíce odstíněn byl atom vodíku pocházející z nasubstituovaného aromatického aminu (C^6NHPh). Zbývající dva pozorované singlety pocházely z purinového kruhu, přičemž byly identifikovány jako atomy vodíku vázaných na C2 a C8.



Obrázek 13: Hmotnostní spektrum prvního řádu purinu **21** získané technikou ESI-MS.

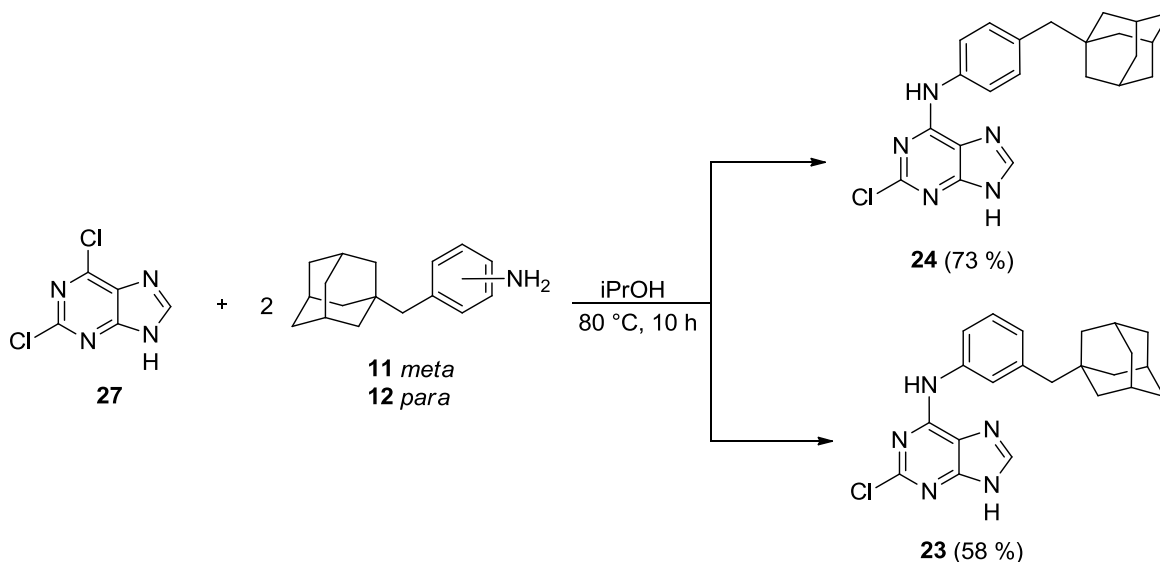
Další technikou použitou k určení struktury připravených látek, byla hmotnostní spektrometrie. S ohledem na povahu uvažovaných sloučenin, byly veškeré analýzy prováděny výhradně v pozitivním skenovacím módu. Na Obrázku **13** je pro ilustraci

znázorněno spektrum prvního řádu sloučeniny **21**. Jak je z tohoto spektra patrné, byly pozorovány celkem čtyři signály. Dominantním byl jedenkrát nabitý ion o m/z 360 odpovídající protonované molekule, následovaný iontem větším o 22 m/z , což naznačuje přítomnost sodného aduktu sloučeniny **21**. Tyto signály byly doprovázeny dvěma vyššími agregáty, které byly identifikovány jako $[2.M+H]^+$ (719 m/z) a $[2.M+Na]^+$ (741 m/z).

9.2 Reakce 2,6-dichlor-9H-purinu s nepolárními aminy

Obdobně jako v kapitole 9.1, byly sloučeniny **11** a **12** ponechány reagovat spolu s 2,6-dichlor-9H-purinem (**Schéma 32**). Indikace konverze výchozí látky byla prováděna opět pomocí TLC. Po ochlazení reakční směs v obou případech suspendovala. Reakční směs byla tedy přefiltrována a promyta ledovým propan-2-olem. Matečný louh byl purifikován sloupcovou chromatografií, přičemž byly získány látky **23** ve výtěžku 58 % a **24** ve výtěžku 73 %. Lze konstatovat, že tyto dvě reakce, ve srovnání se substitucí atomu chloru na purinu **14**, probíhaly (z časového hlediska) téměř identicky.

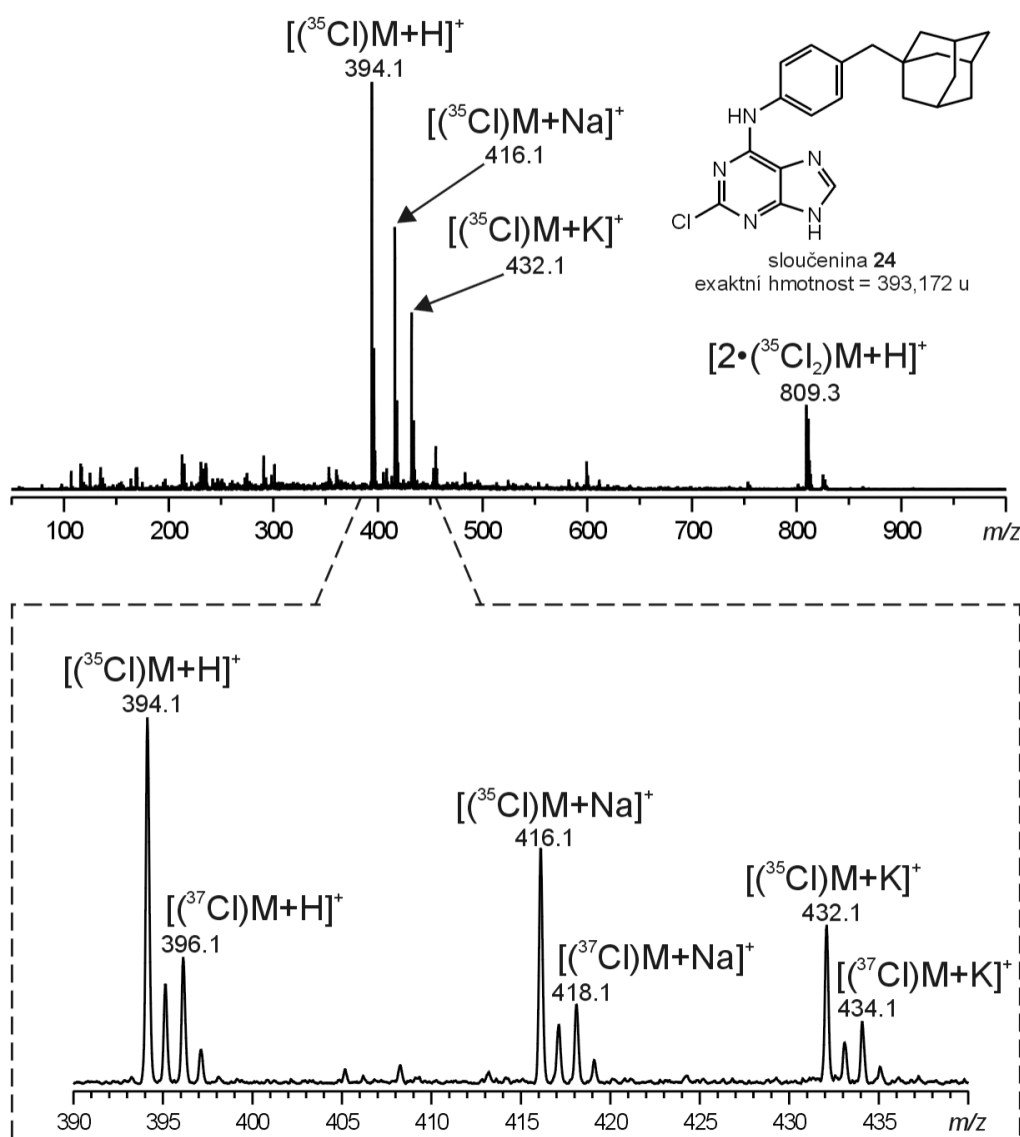
Schéma 32



Struktura sloučenin **21–24** byla navržena na základě výsledků získaných pomocí běžně používaných metod strukturní analýzy (IR, NMR a MS).

V 1H NMR spektru sloučeniny **23** byla patrná přítomnost atomů vodíku pocházejících z 1-adamantylu (1,49–1,91 ppm). Singlet pozorovaný v oblasti 2,33 ppm je charakteristický pro atomy vodíku z methylenového můstku spojujícího fenyl s 1-adamantylem. Na fenylu sloučeniny **23** se vyskytují čtyři „aromatické“ vodíky, jejichž

signály byly pozorovány v oblasti 6,81–7,61 ppm. Nejedstíněnějšími byly atomy vodíku na atomu uhlíku C8 a atomu dusíku C⁶NHPh pozorované v oblasti 8,28 resp. 10,06 ppm. V případě ¹H NMR spektra sloučeniny **24** byly výsledky téměř identické jako v případě purinu **23**, až na výjimku v počtech signálů fenylových atomů vodíku, kde namísto tří signálů, byly patrné dva signály, z nichž každý zastupoval dva ekvivalentní atomy vodíku na benzenovém kruhu. Výše zmíněné poskytlo přesvědčivé důkazy směřující k potvrzení předpokládané struktury obou připravených látek.



Obrázek 14: Hmotnostní spektrum prvního řádu purinu **24** získané technikou ESI-MS.

Vyjma NMR byla struktura sloučenin **23** a **24** navržena také na základě výsledků získaných technikou ESI-MS. Ve spektrech prvního řádu byly pozorovány čtyři signály o m/z 394, 416, 432 a 809, které byly, na základě studia jejich fragmentace za podmínek

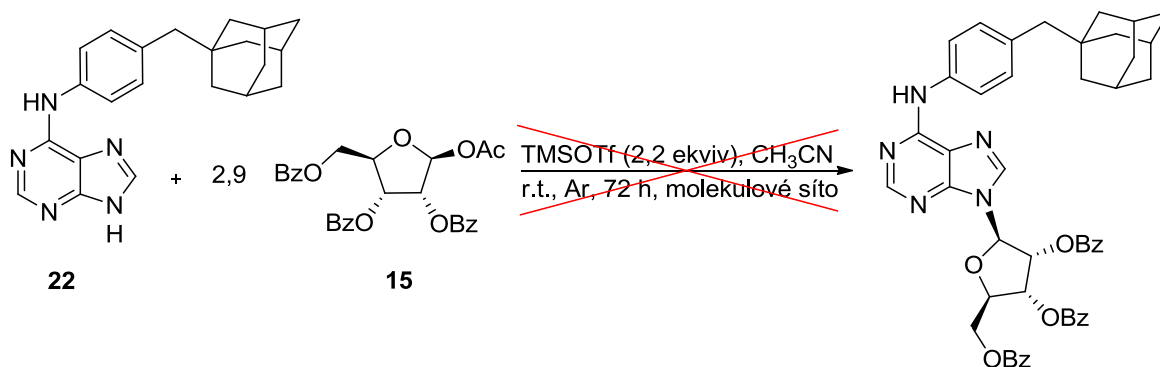
kolizi indukované disociace, identifikovány jako protonovaná molekula, sodný adukt, draselný adukt a dimer protonované molekuly. ESI-MS spektrum sloučeniny **24** je uvedeno na **Obrázku 14** (nahore). Při určování struktury látek **23** a **24** hrál relativně významnou roli rovněž tvar molekulového klastru pozorovaných signálů. V případě signálů odpovídajících monomerní struktuře, bylo patrné, že molekula obsahuje ve své struktuře jeden atom chloru. Tento závěr lze učinit proto, že vzájemný poměr signálu odpovídající isotopu ^{35}Cl a signálu o 2 m/z vyššímu (isotop ^{37}Cl) byl přibližně 100:30, což je pro sloučeniny obsahující jeden atom chloru typické. Detail signálů odpovídajících protonované molekule a jejímu sodnému a draselnému aduktu je pro ilustraci znázorněn na **Obrázku 14** (dole).

9.3 Ribosylace sloučeniny **22**

Dalším úkolem při snaze připravit finální ribonukleosidy obsahující ve své struktuře adamantanový motiv, byla ribosylace sloučenin **21–24**. S ohledem na skutečnost, že k dispozici bylo největší množství purinu **22** (myšleno ve smyslu hmotnosti), bylo rozhodnuto započít ribosylaci právě s touto látkou, a to pro případ, že by se vyskytly komplikace vyžadující opakování reakce. To rozhodnutí se ukázalo být, ve světle dále se odehrávajících událostí, jako relativně správné.

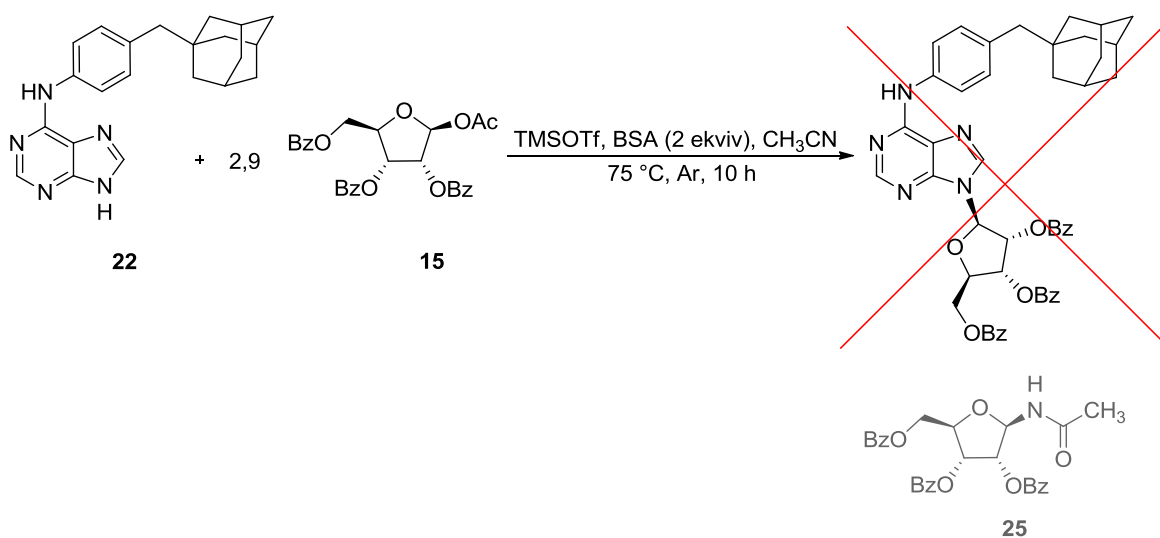
Nejprve byla provedena reakce sloučeniny **22** spolu s látkou **15**, kdy tato reakce probíhala pod ochrannou argonovou atmosférou a v přítomnosti molekulového síta. Po rozpuštění obou reaktantů následovalo přidání činidla TMSOTf do reakční směsi (**Schéma 33**). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě, přičemž ani po 72 hodinách nebyla pozorována tvorba žádného produktu.

Schéma 33



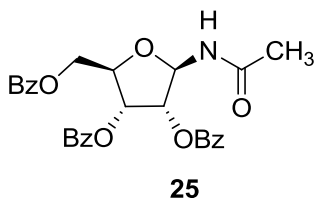
Vzhledem k výše popsanému neúspěchu, byla jako další vyzkoušena analogická reakce s tím rozdílem, že bylo využito BSA, jakožto silylačního činidla (**Schéma 34**).

Schéma 34



Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, přičemž po 10 hodinách byla pozorována úplná konverze výchozí látky. Surový produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií, přičemž byl izolován jediný produkt, který byl dále analyzován pomocí techniky ESI-MS a rovněž byl podroben elementární analýze. V hmotnostním spektru prvního řádu byly pozorovány čtyři signály o m/z 504, 526, 542 a 1029. S ohledem na skutečnost, že signál o m/z 504 byl identifikován jako protonovaná molekula, je zřejmé, že exaktní molekulová hmotnost získané látky činila 503,1 u (atomová hmotnostní jednotka), nikoliv 803,332 u jak se očekávalo pro uvažovaný produkt. V tento okamžik bylo zřejmé, že reakce nevedla k očekávanému produktu, bylo však otázkou, jaká sloučenina byla z reakční směsi vyizolována. Původní předpoklad, že se jedná o výchozí chráněný cukr **15**, se ukázal být téměř ihned lichý. Exaktní molekulová hmotnost sloučeniny **15** je totiž 504,142 u, z čehož vyplývá, že o tuto látku se jednat nemohlo. Navíc, sudá hodnota exaktní molekulové hmotnosti sloučeniny **15** poskytuje informaci, že se v této látce nachází sudý počet atomů dusíku (0, 2, 4, ...), zatímco z ESI-MS analýzy získané sloučeniny bylo zřejmé, že nějaký atom dusíku (1, 3, 5, ...) obsahuje. Důležitou roli při návrhu struktury tohoto nežádoucího produktu sehrála také elementární analýza, z níž vyplynulo, že se v získané sloučenině nachází 2,30 % atomů dusíku. Na základě výše komentovaných dat bylo navrženo, že nežádoucím produktem této reakce by mohl být 2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranosylacetamid (**25**), jehož strukturní vzorec je znázorněn na **Obrázku 15**. Lze se

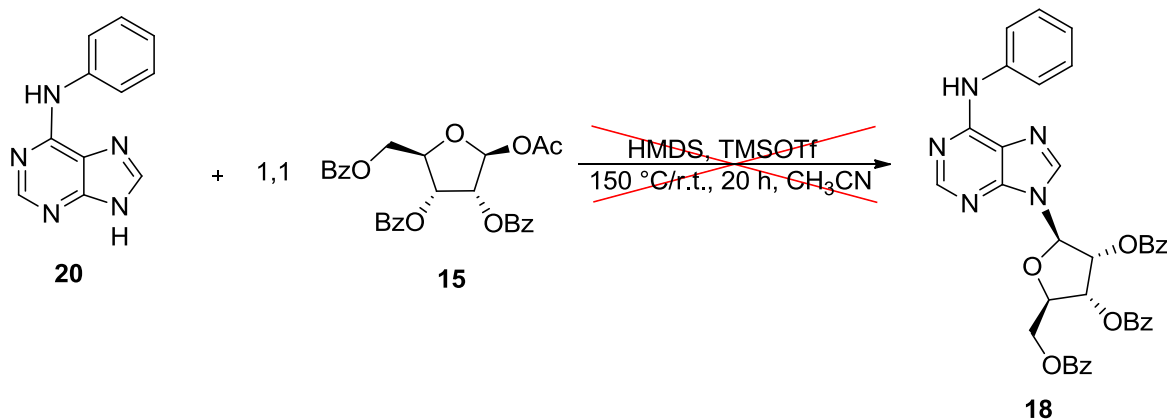
domnívat, že acetamidová skupina, která nahrazuje v molekule acetoxy skupinu, pochází z bis-trimethylsilylacetamidu (BSA), který byl v reakci použit jako silylační činidlo. Podobnou chemickou přeměnu pozorovali ve své práci rovněž Ochoa a spol.²⁰



Obrázek 15: Návrh struktury produktu silylace sloučeniny **22**.

Při zjištění, že reakce za účasti činidla BSA se jeví jako nevhodná, bylo usouzeno, že by mohlo pomoci použití silnějšího silylačního činidla. Proto byl zvolen hexamethyldisilazan (HMDS), aby v této funkci nahradil BSA. Nejprve však bylo nutné celou reakci vyzkoušet na modelové sloučenině. Provedla se tedy reakce látky **20** s látkou **15** (Schéma 35). Výchozí látka byla rozpuštěna v HMDS a reakční směs byla následně refluxována při teplotě 140 °C. Nejprve vznikla suspenze, která se se zvyšující teplotou rozpustila. Po uplynutí 2 hodin byla přidána chráněná ribóza rozpuštěná v CH₃CN a TMSOTf. Podle TLC nebyl pozorován vznik žádného produktu a syntéza sloučeniny **18** tak nebyla za daných podmínek úspěšná.

Schéma 35



ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo syntetizovat nové purinové ribonukleosidy nesoucí 1-adamantylový substituent.

Pro syntézu těchto sloučenin bylo nutné připravit aromatické adamantylem substituované aminy (**11** a **12**). Vycházelo se z adamantyl(fenyl) methanonu, který byl nejprve nitrován za vzniku sloučenin **3** a **4**. Na zmíněné nitroketony byla reakcí s ethan-1,2-dithiolem zavedena dithiolanová chránicí skupina. Tímto způsobem syntetizované nitrodithiolany **5** a **6** byly dále redukovány za vzniku aminodithiolanů **7** a **8**. V posledním kroku syntézy nepolárních 1-adamantylem substituovaných aminů byla pomocí Mozingovy redukce provedena desulfurizace sloučenin **7** a **8**. Získané nepolární aminy **11** a **12** byly dále použity při substituci atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu.

Druhá část diplomové práce spočívala v syntéze samotného 6-chlor-9*H*-purinu (**14**) z hypoxanthinu (**13**) a v následné přípravě purinových derivátů. Sloučenina **14** byla výchozí látkou pro dvě cesty, jejichž cílem bylo získání modelové sloučeniny **18**. Nejprve tak byla v syntetické cestě **I** podrobena nukleofilní aromatické substituci atomu chloru v poloze C6 a následné ribosylaci polohy N9 purinového skeletu. Při provedení syntetické cesty **II** byla sloučenina **14** nejprve ribosylována do polohy N9. Následně byl produkt této reakce (**16**) substituován aromatickým aminem s využitím mechanismu nukleofilní aromatické substituce za vzniku látky **18**. Konečnou reakcí, při které byla získána modelová sloučenina N6-fenyladenosin (**19**), byla deprotektace účinkem methanolátu sodného.

Posledním úkolem bylo syntetizovat požadované purinové ribonukleosidy s adamantanovým skeletem, přičemž, na základě výsledků získaných s modelovým substituentem (anilin) byla zvolena syntetická cesta **II**. Nukleofilní aromatickou substitucí byly reakcí látek **14** a **27** s látkami **11** a **12** připraveny doposud nepopsané adamantylované purinové deriváty (**21**, **22**, **23**, **24**). Nicméně, ani jeden z několika pokusů o následnou ribosylaci atomu dusíku N9 purinového kruhu sloučeniny **22** se nezdařil. Tento neúspěch je, dá se říci, pouze částečný, neboť v budoucnu nevyklučuje úspěšnou přípravu požadovaných ribonukleosidů syntetickou cestou **I**, která je ilustrována na **Schématu 20**. Tyto reakce mohou vést k požadovaným sloučeninám, avšak pravděpodobně na úkor nižších výtěžků a delších reakčních časů.

Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány běžnými metodami strukturní analýzy (IR, NMR a MS).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Wan, K.; Iwasaki, K.; Umotoy, J. C.; Wolan, D. W.; Shenvi, R. A. *Angewandte Communications* **2015**, 54, 2410-2415.
- ² Nobel Media AB 2014. "Emil Fischer - Biographical". *Nobelprizes.org* **2014**.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html
- ³ Hyon, K. Ch.; Atkinson, K.; Karlson, E. W.; Willett, W.; Curhan, G. *The New England Journal of Medicine* **2004**, 350, 1093-1103.
- ⁴ Ishikawa, T.; Wanping, A.; Kiyoko, K. *Pharmaceuticals* **2013**, 6, 1347-1360.
- ⁵ Gornall, A. G.; Hunter, A. *Journal of Biological Chemistry* **1943**, 593-615.
- ⁶ Turek, P.; Novák, P.; Pohl, R.; Hocek, M.; Kotora, M. *Journal of Organic Chemistry*. **2006**, 71, 8978- 8981.
- ⁷ Holý, A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 1. vyd.; Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, 2004.
- ⁸ Lopes, L. V.; Sebastião, A. M.; Ribeiro, J. A. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, 11, 1-16.
- ⁹ Saladino, R.; Crestini, C.; Costanzo, G.; Negri, R.; Di Mauro, E. *Bioorganic and Medical Chemistry* **2001** 9, 1249-1253.
- ¹⁰ García-Rubiño, M. E.; Choquesillo-Lazarte, D.; Núñez, M. C.; Campos, J. M. *Crystal Structure Communications* **2011**, 67, 484-486.
- ¹¹ Zeng, Q.; Huang, B.; Danielsen, K.; Shukla, R.; Nagy, T. *Organic Process Research & Development* **2004**, 8, 962-963.
- ¹² Bendich, A.; Russell Jr., P. J.; Fox, J. J.; 6-chlorpurine and purine. **1954**, 76, 6073-6077.
- ¹³ Guo, J.; Ye, X. *Molecules* **2010**, 15, 7235-7265.
- ¹⁴ Hocek, M.; Holý, A.; Dvořáková, H. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2002**, 67, 325-335.
- ¹⁵ Wei, X.; Ma, Y.; Wu, Q.; Zhang, J.; Cai, Z.; Lu, M. *Molecules* **2015**, 20, 21681-2169.
- ¹⁶ Staněk, J. *Monosacharidy*. 1. vyd. Praha: Nakl. Československé akademie věd, 1960, 519 s.

- ¹⁷ Pazynina, G.; Nasonov, V.; Belyanchikov, I.; Brossmer, R.; Maisel, M.; Tuzikov, A.; Bovin, N. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2010**, 1-8.
- ¹⁸ Hermanová, J. Příprava N9-glukosylovaných purinů. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012.
- ¹⁹ Vorbrüggen, H.; Niedballa, U. *Journal of Organic Chemistry* **1974**, 39, 3654-3672.
- ²⁰ Ochoa, C.; Provencio, R.; Jimeno, M. L.; Balzarini, J.; Clercq, E. *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17, 901-910.
- ²¹ Mosselhi, M. A. N.; Break, L. M. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2011**, 30, 681-695.
- ²² Sivets, G. G. *Tetrahedron Letters* **2016**, 57, 268-271.
- ²³ Griffon, J.; Dumas, A.; Storer, R.; Sommadossi, J.; Gosselin, G. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2009**, 28, 435-449.
- ²⁴ Krömer, M. Nové modifikované 7-deazapurinové báze a nukleosidy. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2015.
- ²⁵ Tunçbilek, M.; Ates-Alagöz, Z.; Altanlar, N.; Karayel, A.; Özbey, S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 1693-1700.
- ²⁶ Perlíková, P.; Konečný, P.; Nauš, P.; Snášel, J.; Votruba, I.; Džubák, P.; Pichová, I.; Hajdúch, M.; Hocek, M. *Medicinal Chemical Communications* **2013**, 4, 1497-1500.
- ²⁷ Hocek, M.; Šilhár, P.; Shih, I.; Mabery, E.; Mackman, R. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 5290-5293.
- ²⁸ Nauš, P.; Caletková, O.; Konečný, P.; Džubák, P.; Bogdanová, K.; Kolář, M.; Vrbková, J.; Slavětínská, L.; Tloušťová, E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 1097-1110.
- ²⁹ Hocek, M.; Holý, A.; Votruba, M.; Dvořáková, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 1817-1825.
- ³⁰ Klečka, M.; Poštová Slavětínská, L.; Tloušťová, E.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M. *Medicinal and Chemical Communications*. **2015**, 6, 576-580. , 2015, 6, 576-580
- ³¹ Gergela, D. Příprava 6,9-disubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013.

- ³² Snášel, J.; Nauš, P.; Dostál, J.; Hnízda, A.; Fanfrlík, J.; Brynda, J.; Bourderioux, A.; Dušek, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 8268-8279.
- ³³ Jašková, E. Inhibitory cyklin-dependentních kináz a transkripční stres. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2010.
- ³⁴ Kočvarová, K. Studium přípravy purinových sloučenin substituovaných 1-adamantylem. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015.
- ³⁵ Taddei, D.; Kilian P.; Slawin A.M.Z.; Woollins D.J. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 665–670.
- ³⁶ Klebe, J.; Finkbeiner, H.; White, D. *Journal of Organic Chemistry* **1966**, 28, 3390-3395.
- ³⁷ Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C.; *The Handbook of Nucleoside Synthesis*; Wiley & Sons, Inc., 2002.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ad	1-Adamantyl
AdH	Adamantan
ADP	Adenosindifosfát
Ad-ASM	1-Adamantylasmarin
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BiPh-ASM	4-Bifenylasmarin
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
CDK	Cyklin-dependentní kináza
CID	Kolizí indukovaná disociace
DEE	Diethylether
DMA	Dimethylanilin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethyl-acetát
ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
HEK 293	Embryotické ledvinové buňky
HeLa	Děložní adenokarcinom
HL-60	Lidská myeloidní leukémie
HMDS	Hexamethyldisilazan
NMR	Nukleární magnetická rezonance
HT-29	Kolorektální adenokarcinom

IC ₅₀	Koncentrace sloučeniny inhibující 50 % enzymu
IR	Infračervená spektrometrie
JurKat	Akutní lymfatická leukémie
MCF-7	Karcinom prsu
MDA-MB 231	Prsní adenokarcinom
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
P	Fosfát
p-TSA	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
Ra-Ni	Raneyův nikl
Rib	Ribóza
RNA	Ribonukleová kyselina
r.t.	Laboratorní teplota
RVO	Rotační vakuová odparka
TFA	Trifluoroctová kyselina
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TMSOTf	Trimethylsilyl trifluormethansulfonová kyselina
TPPTS	Trisodná sůl trifenylfosfintrisulfonové kyseliny
t _R	Retenční čas
t _t	Teplota tání

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Čtyři existující tautomery purinového kruhu.....	12
Obrázek 2: Strukturní vzorce adeninu (vlevo) a guaninu (vpravo).....	13
Obrázek 3: Strukturní vzorec ATP.....	13
Obrázek 4: Vybrané deriváty purinu.	14
Obrázek 5: Nejběžněji používané druhy chráněné ribózy.....	18
Obrázek 6: Strukturní vzorce účinných antituberkulotik.	26
Obrázek 7: Strukturní vzorce vybraných inhibitorů CDK.....	27
Obrázek 8: Vybrané synteticky připravené deriváty asmarinu.....	28
Obrázek 9: Vybrané přírodní deriváty asmarinu.	28
Obrázek 10: GC-MS průběhu Mozingovy redukce látky 8 (A, B) a hmotnostní spektra vznikajících sloučenin (C, D).	50
Obrázek 11: Pravděpodobné vedlejší produkty Mozingovy redukce.....	51
Obrázek 12: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny 19 (nahore) a MS/MS spektrum iontu o m/z 344 (dole).....	59
Obrázek 13: Hmotnostní spektrum prvního řádu purinu 21 získané technikou ESI-MS.....	63
Obrázek 14: Hmotnostní spektrum prvního řádu purinu 24 získané technikou ESI-MS.....	65
Obrázek 15: Návrh struktury produktu silylace sloučeniny 22	68

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vybrané katalyzátory a následné produkty kondenzace formamidu. 16

Tabulka 2: Koncentrace vybraných látek proti nádorovým buněčným liniím..... 27