

# Příprava *N*9-glukosylovaných purinů

Bc. Jana Hermanová

---

Diplomová práce  
2012

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav chemie  
akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana HERMANOVÁ**  
Osobní číslo: **T10436**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Příprava N9-glukosylovaných purinů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Zpracovat rešerši o přípravách, výskytu v přírodě a biologické aktivitě různě substituovaných purinů obsahujících glykosidickou složku.

### II. Praktická část

1. Provést glukosylaci 2,6-dichlor-9H-purinu za různých podmínek.
2. Substituovat atom chloru v poloze 6 vybranými aromatickými aminy.
3. Pokusit se o konverzi atomu chloru v poloze 2 na primární amin.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HANESSIAN, Stephen. *Preparative carbohydrate chemistry*. 1. vydání. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. ISBN 0-8247-9802-3

[2] STANĚK, Jaroslav, a kol. *Monosacharidy*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1960

[3] Dle provedení literární rešerše s využitím databáze Scopus

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ...HELIPIALOVÁ JANA.....

Obor: ...EMENIE POJIVIN A BIOALTERNIVNICH CATEK.....

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 11.5.2012

.....Helipialová J.....

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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 výdělku 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 výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá zhodnocením reakčních podmínek pro přípravu *N9*-glukosylovaných purinů. U takto připravených látek jsou následně provedeny nukleofilní aromatické substituce do polohy 6 purinového kruhu primárními aminy. V závěrečném kroku jsou odstraněny ze získaných nukleosidů ochranní skupiny z cukerné složky. Struktury připravených sloučenin byly potvrzeny prostřednictvím metod strukturní analýzy, zejména hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací.

Klíčová slova: glykosylace, deacylace, puriny, nukleosidy, ESI-MS.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with evaluation of reaction conditions for the preparation of *N9*-glucosylated purines. Moreover, the nucleophilic aromatic substitutions of prepared compounds at the 6-position of the purine ring with primary amines was studied. Finally, removing of protecting groups from the sugar components of the obtained nucleosides was made. The structure of all prepared compounds was confirmed using structural analysis methods, especially by electrospray ionization mass spectrometry.

Keywords: glycosylations, deacylations, purines, nucleosides, ESI-MS.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce Ing. Romanu Kimmelovi Ph.D. za cenné odborné rady a čas, který mi byl ochoten při vzniku této práce věnovat.

Ráda bych také poděkovala Ing. Michalu Rouchalovi Ph.D. rovněž za velkou pomoc a trpělivost.

V neposlední řadě pak patří mé velké díky kolektivům laboratoří č. 102 a č. 431 za příjemné pracovní prostředí.

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

## OBSAH

ÚVOD .....	10
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1</b> <b>STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA MONOSACHARIDŮ</b> .....	<b>12</b>
1.1    D-GLUKOSA .....	13
1.2    GLYKOSYLHALOGENIDY .....	13
<b>2</b> <b>GLYKOSIDY A GLYKOSYLAČNÍ METODY</b> .....	<b>15</b>
2.1    GLYKOSIDY .....	15
2.2    GLYKOSYLAČNÍ METODY.....	15
2.2.1    Michaelova metoda .....	18
2.2.2    Helferichova metoda a její modifikace .....	18
2.2.3    Modifikace Koenigsovy-Knorrovy metody .....	19
<b>3</b> <b>GLYKOSYLOVANÉ DERIVÁTY PURINŮ</b> .....	<b>22</b>
3.1    BIOLOGICKÉ ÚČINKY GLYKOSYLOVANÝCH PURINŮ .....	22
3.1.1    Ribosylované a deoxyribosylované puriny.....	22
3.1.2    Glukosylované puriny.....	26
3.2    NUKLEOFILNÍ AROMATICKÉ SUBSTITUCE DO POLOHY 6 PURINOVÉHO SKELETU .....	27
3.3    DEACYLACE.....	30
<b>II</b> <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b> <b>POPIS POUŽITÉHO PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b> <b>PŘÍPRAVA N<sup>9</sup>-GLUKOSYLOVANÝCH PURINŮ</b> .....	<b>35</b>
5.1    GLUKOSYLACE 2,6-DICHLOR-9H-PURINU ZA RŮZNÝCH REAKČNÍCH PODMÍNEK.....	35
5.2    NUKLEOFILNÍ AROMATICKÁ SUBSTITUCE SLOUČENINY <b>3a</b> DO POLOHY C6 .....	37
5.3    DEACETYLACE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN.....	39
<b>III</b> <b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b> <b>ORGANICKÉ SYNTÉZY A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKA             PŘIPRAVENÝCH LÁTEK</b> .....	<b>41</b>
6.1    GLUKOSYLACE 2,6-DICHLOR-9H-PURINU ZA RŮZNÝCH REAKČNÍCH PODMÍNEK.....	41
6.2    NUKLEOFILNÍ AROMATICKÁ SUBSTITUCE SLOUČENINY <b>3a</b> DO POLOHY C6 .....	43
6.3    DEACETYLACE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN.....	46
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>49</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>53</b>



<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>55</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>56</b>

## ÚVOD

Je všeobecně známo, že se purin jako takový v čisté formě v přírodě nevyskytuje, přesto tvoří důležitou součást „základu existence“, a to „polovinu“ genetického kódu. Od jeho struktury je odvozena také celá řada dalších sloučenin, známé jako puriny. Podstatou významných biologických účinků purinů a jejich glykosylovaných derivátů je napodobování sloučenin, které se přirozeně vyskytují v živých organismech. Různě tak mohou významně ovlivňovat např. diferenciaci buněk, účinnost některých enzymů a hormonů, biosyntézu proteinů či nukleových kyselin.

Předpokladem přítomnosti cukerného zbytku na purinovém skeletu v poloze N9 je, želepší jejich rozpustnost a mobilitu ve vodných médiích. Protože existuje velké množství derivátů purinu s ribosou, soustředila se tato práce na přípravu glukosylovaných purinů, kdy za různých reakčních podmínek byla získána výchozí sloučenina, jež byla dalšími organickými reakcemi různě transformována.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA MONOSACHARIDŮ

Sacharidy patří k nejrozšířenějším, biologicky nejdůležitějším a současně také k nejdéle známým organickým sloučeninám. Velmi zjednodušeně lze tyto látky definovat, jako polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony s nejméně třemi alifaticky vázanými atomy uhlíku přičemž alespoň jedna hydroxylová skupina je vázaná na asymetrickém atomu uhlíku<sup>1</sup>. Sacharidy je možné klasifikovat dle funkčních skupin nacházejících se v molekule, počtu atomů uhlíku či počtu sacharidových jednotek v molekule<sup>2</sup>.

Základní monosacharidy jsou potom takové látky, které hydrolýzou složitějších sacharidů, oligosacharidů a polysacharidů, neposkytují další nižší jednotky<sup>1</sup>. Jsou odvoditelné od nejjednodušších cukrů, glycerinaldehydu a dihydroxyacetonu (**Obrázek 1**).



**Obrázek 1:** Strukturní vzorce základních monosacharidů.

Protože nejčastější seskupení v molekule cukru (CHOH) obvykle obsahuje chirální atom uhlíku, existuje podle počtu takovýchto uhlíků vždy určité množství konfiguračních izomerů pro daný monosacharid<sup>3</sup>.

Ve skutečnosti se monosacharidy jen málokdy vyskytují v lineárních formách. Dochází u nich k intramolekulární cyklizaci, kdy jedna ze vzdálenějších hydroxylových skupin (nejčastěji umístěná v poloze C4 či C5) interaguje s karbonylovou skupinou za vzniku hemiacetalové (poloacetalové) formy monosacharidu. Vytváří se tak pětičlenný nebo šestičlenný heterocyklický systém obsahující kyslíkový heteroatom a rovněž dochází ke vzniku dalšího chirálního centra. Tento uhlík se pak nazývá anomerní a odpovídající dvojice diastereomerů je označována jako  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomery (**Obrázek 2**)<sup>2</sup>.



**Obrázek 2:** Příklady dvou diastereomerů D-glukopyranosy (anomerní atom uhlíku je u každé sloučeniny označen hvězdičkou).

## 1.1 D-Glukosa

Z monosacharidů má největší praktický význam. Nachází se ve zralém ovoci, v medu společně s fruktosou a v koncentraci  $3,6\text{--}5,6\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  také v lidské krvi (na lačno). Její prvořadou funkcí je „spálení“ v živém organismu s cílem uvolnit tak potřebnou a v této formě i poměrně snadno dostupnou energii. Je přímým produktem fotosyntézy, základní stavební jednotkou maltosy, laktosy, sacharosy a monomerem mnoha složitějších organických sloučenin, jako je škrob, celulóza,  $\beta$ -glukany nebo glykogen<sup>2,4</sup>.

Jeden z nejběžnějších způsobů využití glukosy v klinické praxi představují glukosové transfúze aplikované v podobě umělé výživy. Z potravinářského a farmaceutického hlediska je důležitou surovinou pro výrobu řady produktů. Redukcí D-glukosy se vyrábí D-sorbitol, nejpoužívanější sladidlo pro diabetické účely<sup>3</sup>, hydrogenací za přítomnosti methylaminu vzniká *N*-methyl-D-glukamin, který se používá k převádění jiných sloučenin (sulfonamidy, sulfony, léčiva obsahující ve své molekule aminoskupinu) na rozpustnější formy ve vodných mediích, navíc esterifikací jejich cukerných alkoholů se připravují rovněž některé trhaviny<sup>1</sup>.

D-Glukosa je také výchozí látkou pro syntetickou výrobu kyseliny askorbové (vitaminu C), surovinou pro fermentační výrobu ethanolu a alkoholických nápojů (pivo, víno, aj.) působením kvasinek rodu *Saccharomyces*. Působením jiných mikroorganismů lze vyrábět i jiné důležité organické sloučeniny, jako butanol, glycerol, aceton, kyselinu mléčnou, kyselinu citronovou a další<sup>2</sup>.

## 1.2 Glykosylhalogenidy

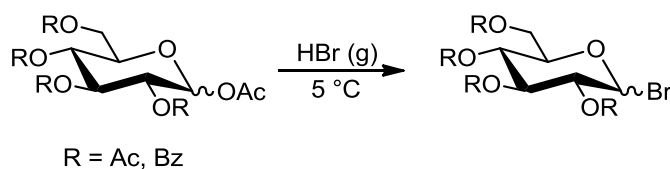
Glykosylhalogenidy, nebo též halogenosy, patří mezi nejvýznamnější meziprodukty syntéz v řadě sacharidů. Poloacetalová skupina je v molekule monosacharidů nahrazena atomem některého z halogenů<sup>1</sup>. Na základě typu anomerní skupiny a jejich aktivačních metod lze tyto látky rozdělit do čtyř skupin<sup>5</sup>:

- glykosylbromidy,
- glykosylchloridy,
- glykosyljodidy,
- glykosylfluoridy.

Obvykle jsou tyto sloučeniny připravovány v plně acylované, zpravidla v acetylované nebo benzylované, formě<sup>1-5</sup>. Výhodou benzylovaných sacharidů oproti acetylovaným derivátům je možnost jejich detekce na TLC pod UV-lampou, což značně usnadňuje monitorování průběhu prováděných reakcí.

Nejrozšířenějšími výchozími látkami pro přípravu acylovaných halogenos jsou 2,3,4,6-tetra-*O*-acylované deriváty monosacharidů nesoucí na atomu uhlíku C1 acetyloxylovou skupinu. Méně často to ovšem mohou být také anhydrocukry, nebo glykaly. Na **Schématu 1** je například znázorněno působení bromovodíku na plně acylovaný derivát monosacharidu za vzniku glykosylbromidu<sup>1</sup>. Lze je však připravit i vzájemnou výměnou halogenů<sup>6</sup>.

**Schéma 1**



Glykosylhalogenidy se využívají především k syntézám glykosidů, glykalů, anhydrocukrů, orthoesterů, thioglykosidů, selenocukrů, glykosenů, disacharidů a mnoha dalších sloučenin<sup>1</sup>.

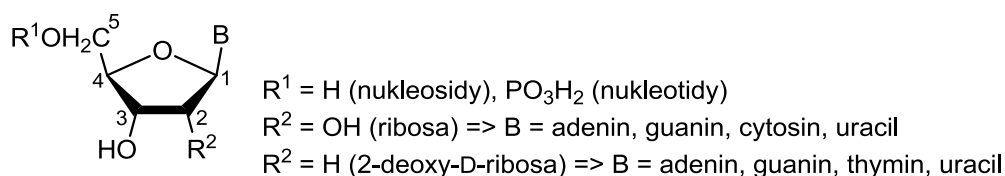
## 2 GLYKOSIDY A GLYKOSYLAČNÍ METODY

### 2.1 Glykosidy

Glykosidy jsou sloučeniny odvozené od pyranosové nebo furanosové formy tak, že atom vodíku anomerní hydroxylové skupiny je nahrazen alkylovou nebo arylovou skupinou. Tyto sloučeniny jsou značně rozšířeny v rostlinách, kde se jako aglykony (necukerná složka) vyskytují např. alicyklické alkoholy, fenoly, steroidy, terpeny aj. Zastoupeny jsou také sirté a dusíkaté analogy glykosidů (thioglykosidy a glykosylaminy)<sup>3</sup>.

Glykosylaminy vznikají reakcí aldós nebo ketos s amoniakem, primárními či sekundárními aminy a vlastnostmi se glykosidům podobají jen do určité míry.

Z biochemického a terapeutického hlediska jsou nejvýznamnějšími glykosylaminy nukleosidy a nukleotidy (**Obrázek 3**), které vznikají esterifikací nukleosidů na C5 ribosového kruhu kyselinou fosforečnou a jsou základními stavebními složkami nukleových kyselin DNA a RNA<sup>7</sup>.



**Obrázek 3:** Obecná struktura nukleosidů a nukleotidů.

Analogy přírodních nukleosidů modifikované v heterocyklické bázi nebo v cukerné části mají významné biologické účinky a terapeuticky se využívají v podobě cytostatik, antivirotik, antibiotik apod. Velmi často se připravují, podobně jako glykosidy, reakcemi bází s glykosylhalogenidy<sup>3</sup>.

### 2.2 Glykosylační metody

Glykosylací je myšlena reakce, ve které dochází k navázání sacharidu, jakožto glykosylového donoru, na příslušnou funkční skupinu glykosylového akceptoru (aglykonu).

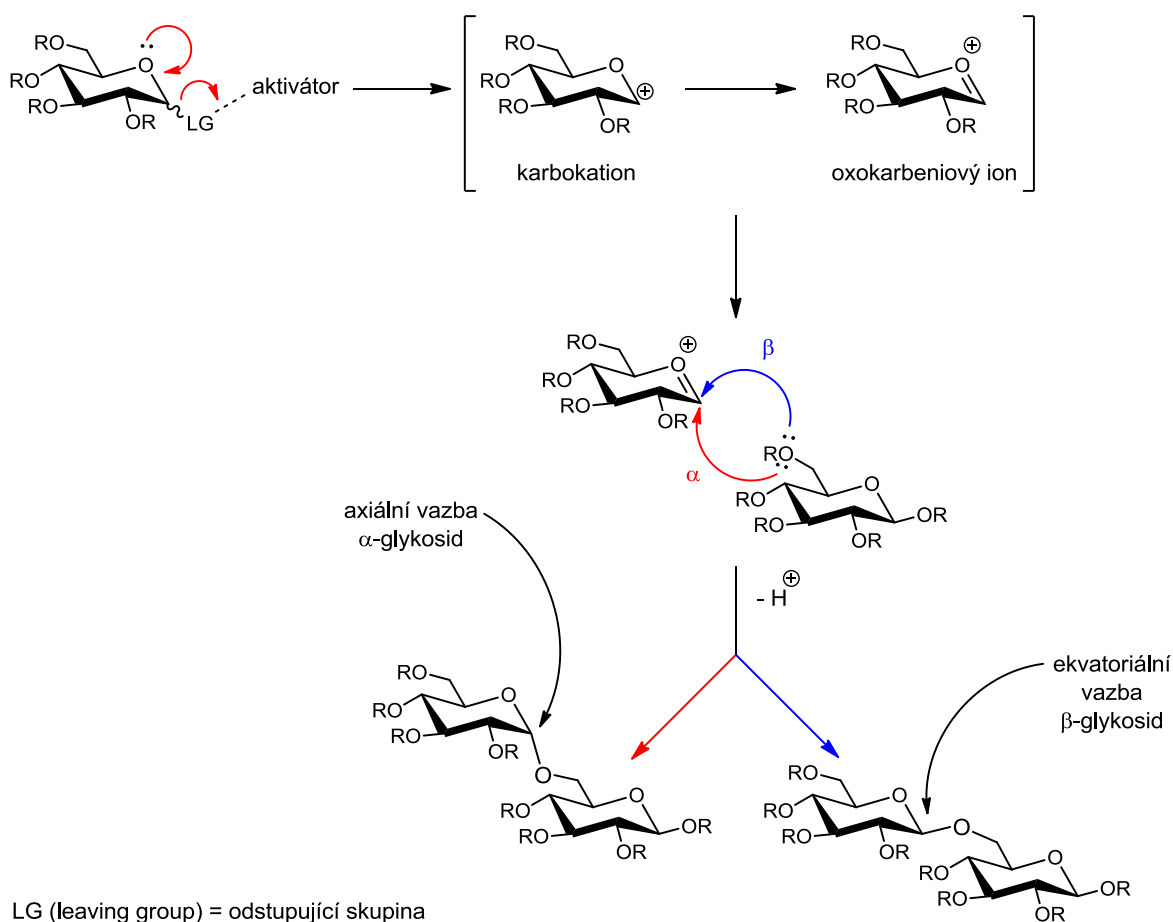
Glykosylace jako takové je velmi obtížné popsat obecným mechanismem<sup>8</sup>. Jednotlivé prozkoumané postupy se omezují na určitý typ aglykonu a mnohdy je jejich použití dáno také typem monosacharidu. Lze tedy říci, že syntéza téměř každého jednotlivého glykosidu

vyžaduje specifické podmínky, které jsou odlišné od optimálních podmínek přípravy jiného glykosidu<sup>1</sup>. Přesto je možné v jednotlivých reakcích nalézt několik shodných rysů, na jejichž základě byl přijat jistý obecný mechanismus (**Schéma 2**)<sup>8</sup>.

Nejčastěji glykosylace zahrnují nukleofilní přesun do anomerního centra, tedy na atom uhlíku C1, mechanismem  $S_N1$ . Ve většině případů aktivátor (promotor nebo katalyzátor) zajišťuje odstoupení anomerní odstupující skupiny za vzniku glykosylového karbokationtu, ze kterého se následně vytvoří stabilnější oxokarbeniový ion<sup>8</sup>.

Glykosylace povětšinou probíhá s inverzí konfigurace na anomerním atomu uhlíku, avšak to jestli vznikne  $\alpha$ -,  $\beta$ -glykosid, nebo jejich směs, závisí na struktuře a konformaci výchozích látek, reakčních podmínkách, použití rozpouštědla, promotoru, sterickém bránění, odstupujících skupinách a typu chránících skupin<sup>3</sup>.

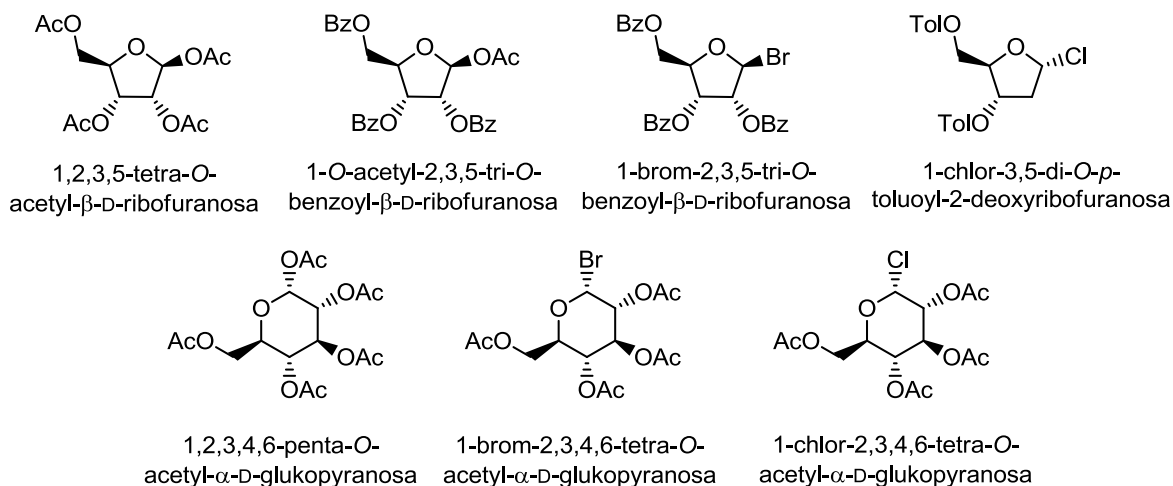
**Schéma 2**





Ačkoli je produkt s konfigurací  $\alpha$  termodynamicky výhodnější díky působení anomerního efektu, převládá množství kinetického produktu s konfigurací  $\beta$ , který vzniká často důsledkem ireversibilního charakteru glykosylace komplexu aglykonů.

Glykosylace většinou vychází z plně acylovaných monosacharidů a jejich derivátů (**Obrázek 4**). Nejběžněji aplikované chránící skupiny jsou benzoylové, acetylové a toluoylové, ostatní (např. azidové, benzylové) jsou používány příležitostně<sup>8</sup>.



**Obrázek 4:** Přehled používaných chráněných derivátů monosacharidů.

Mezi lety 1900–1960 se jako glykosylové donory používaly zejména hemiacetaly, acetaly, bromidy nebo chloridy. Později byly preferovány spíše fluoridy, orthoestery, *S*-alkyly/aryly a od roku 1980 s vlnou nových glykosylačních metod takové glykosylové donory jako např. jodidy, glykaly, epoxidy, disulfidy, thioglykosidy, selenoglykosidy, fosfity, fosfáty, sulfoxidy a mnoho dalších<sup>8,9</sup>.

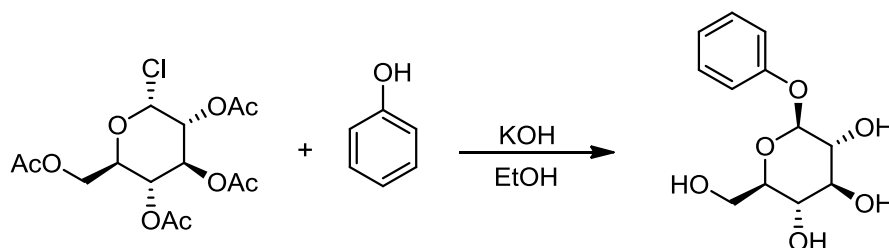
Aromatické glykosidy je možné připravit Michaelovou metodou, Helferichovou metodou a její modifikací, ale především se využívá různých modifikací Koenigsovy-Knorrovy metody. Tyto reakce jsou vhodné i pro přípravu glykosidů, kde jako aglykon vystupují heterocyklické sloučeniny.

Glykosylace purinů jsou zřídka regioselektivní<sup>10</sup> a obvykle vzniká směs izomerů N7 a N9. Tento poměr se dá docela dobře upravit výběrem správných reakčních podmínek (vč. katalyzátorů), purinových derivátů s objemným substituentem v poloze C6 a vhodných glykosylových donorů<sup>9</sup>.

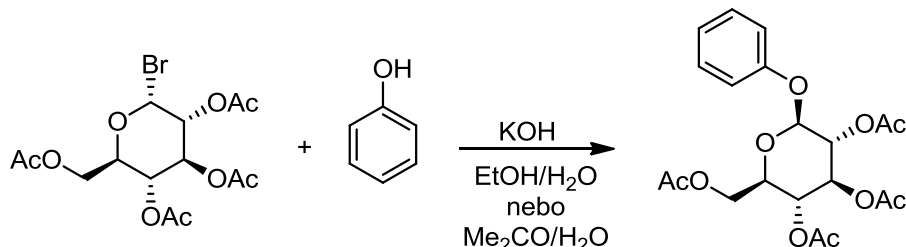
### 2.2.1 Michaelova metoda

Nejstarší metoda přípravy syntetických aromatických glykosidů byla poprvé představena Michaelem. Jednalo se o reakci acetylglykosylhalogenidů (Cl, Br) s fenoly za přítomnosti alkalických hydroxidů v prostředí absolutního ethanolu, kde kromě substituce atomu halogenidu za Waldenova zvratu došlo i k odštěpení acetylových skupin (**Schéma 3**). V pozdější modifikaci byl absolutní ethanol nahrazen vodně alkoholovým nebo acetonovým prostředím, čímž bylo možné získat i plně acetylované glykosidy (**Schéma 4**)<sup>1</sup>. Výtěžky reakcí nejsou v použitém literárním zdroji uvedeny.

**Schéma 3**



**Schéma 4**

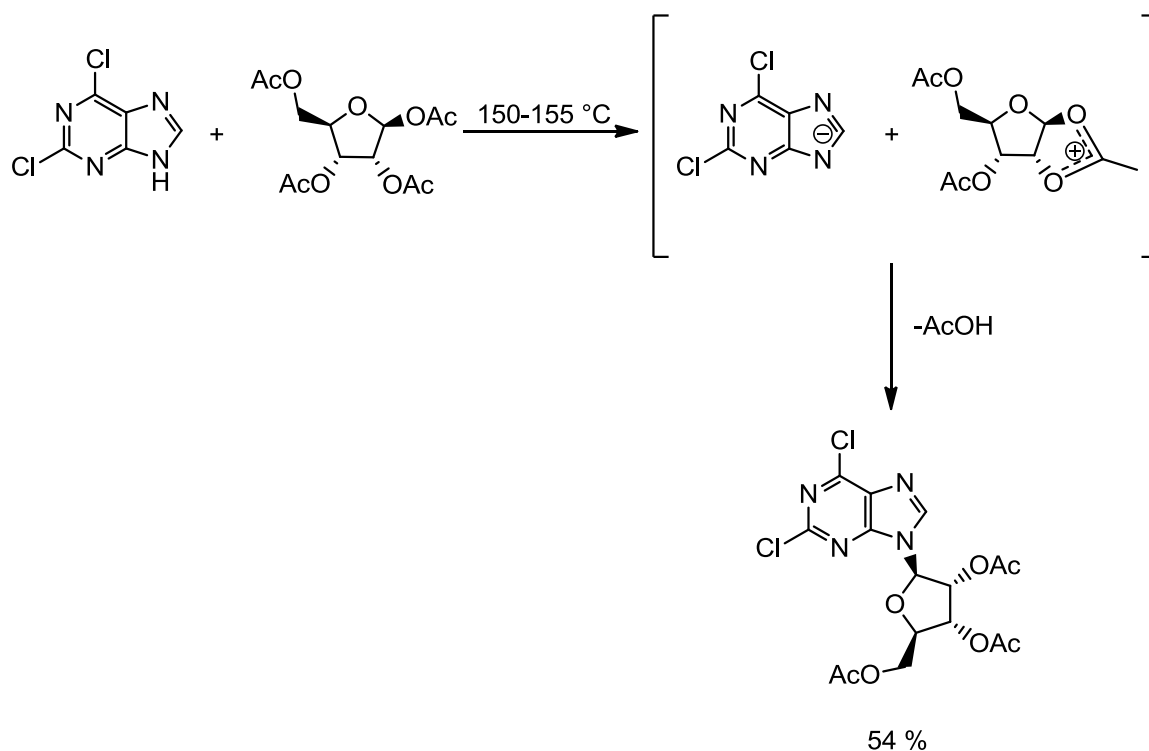


### 2.2.2 Helferichova metoda a její modifikace

Výhodou postupu, který popsali Helferich a Schmitz-Hillebrecht, je možnost použití plně acetylovaných derivátů monosacharidů namísto acetylovaných glykosylhalogenidů, jejichž příprava je složitější<sup>1</sup>.

Na **Schématu 5** je popsána reakce, při níž zahříváním peracetylované ribosy s 2,6-dichlor-9H-purinem v tavenině za přítomnosti katalytického množství Lewisových kyselin vznikají intermediáty, které následně vzájemně reagují za tvorby odpovídajícího nukleosidu a uvolnění kyseliny octové<sup>11</sup>.

Schéma 5



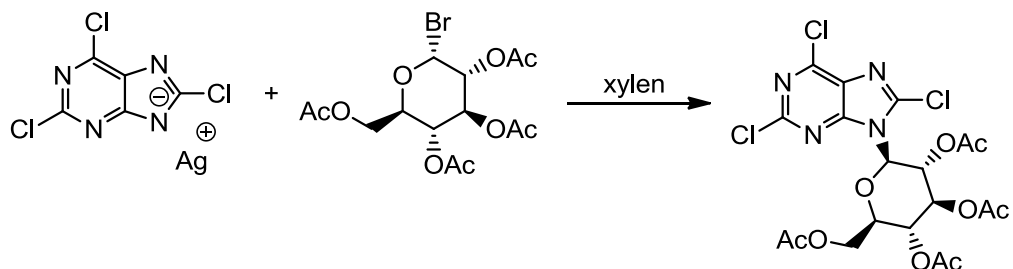
Při reakci za přítomnosti *p*-toluensulfonové kyseliny za nižší teploty a kratší reakční doby vznikají acetylované glykosidy s nezměněnou anomerní konfigurací, zatímco přítomnost chloridu zinečnatého, vyšší teplota a delší reakční doba podporují vznik glykosidů s inverzí konfigurace<sup>1</sup>.

### 2.2.3 Modifikace Koenigsovy-Knorrovy metody

Velmi oblíbená a často používaná metoda, při níž běžně dochází k aktivaci anomerního centra na glykosylhalogenidu v přítomnosti nadbytečného množství solí těžkých kovů<sup>12</sup> jako promotoru (např.  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{AgClO}_4$ ,  $\text{HgBr}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ) a jeho následnému navázání na glykosylový akceptor. Této aktivaci může předcházet *in situ* generace reaktivnějšího  $\beta$ -halogenidu<sup>1</sup>.

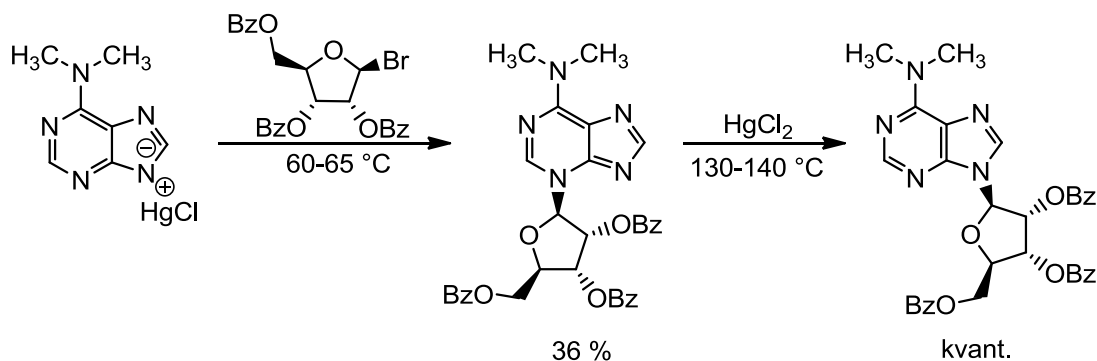
Na **Schématu 6** je uvedena reakce stříbrné soli 2,6,8-trichlor-9*H*-purinu s chráněným halogenidem cukru v xylenu za vzniku odpovídajícího glukopyranosidu<sup>13</sup>.

Schéma 6



Rtuťnaté soli purinů mohou reagovat s ekvivalentním množstvím cukrů. Reakcí 1-brom-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranosu s *N,N*-dimethyladeninem dochází ke vzniku *N*3-nukleosidu, který po zahřátí s  $\text{HgCl}_2$  přesmykuje na *N*9-nukleosid (Schéma 7). Vzhledem ke snížené polaritě rtuťnatých solí, jakož i jejich lepší rozpustnosti, jsou tyto preferovány před stříbrnými<sup>14</sup>.

Schéma 7



Tato metoda však není z několika důvodů příliš vhodná. Kromě směsi produktů a nízkých výtěžků, zůstává v reakci i určité množství toxické rtuti, která může ovlivňovat případné testy biologických účinků připravených sloučenin<sup>15</sup>.

Za nejvhodnější jsou proto považovány sodné soli purinových sloučenin a jiných heterocyklických systémů připravovaných reakcí s hydridem sodným či jinou analogickou bází. Takto připravené soli reagují s 1-chlor-3,5-di-*O-p*-toluoyl-2-deoxyribofuranosou v acetonitrilu pod inertní atmosférou (Schéma 8).



### 3 GLYKOSYLOVANÉ DERIVÁTY PURINŮ

Puriny představují rozsáhlou skupinou chemicky obdobných sloučenin odvozených od základního skeletu nazvaného roku 1884 Emilem Fischerem purin. Tvoří nejrozšířenější druh dusíkatých heterocyklů v přírodě a jejich široké spektrum biologických účinků vyplývá z podobnosti vlastních struktur molekulám běžně se vyskytujícím v živých systémech. Tato analogie imitace platí i u glykosylovaných purinů.

#### 3.1 Biologické účinky glykosylovaných purinů

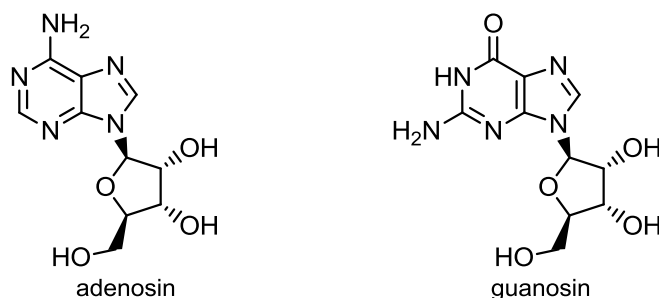
Purinových derivátů, v nichž je obsažena molekula ribosy, existuje několika násobně více, než těch, kde je cukernou složkou glukosa, a to právě z toho důvodu, že ribosa je nepostradatelnou složkou nukleotidů, jakožto základních stavebních kamenů nukleových kyselin, nebo součástí důležitých kofaktorů nikotinamidadeninulkeotidu (NAD) a nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP). Její fosforylovaná forma vstupuje do pentosového cyklu, ve kterém dochází k přeměnám monosacharidů a redukci NADPH nutného k redukčním syntézám v organismu (např. fotosyntéza, syntéza mastných kyselin, apod.)<sup>3</sup>.

##### 3.1.1 Ribosylované a deoxyribosylované puriny

Typickým příkladem jsou samozřejmě adenosin a guanosin (**Obrázek 5**), čili běžné purinové nukleosidy, jež se společně s pyrimidinovými nukleosidy ve formě monofosfátů podílejí na utváření základního genetického kódu v DNA a RNA.

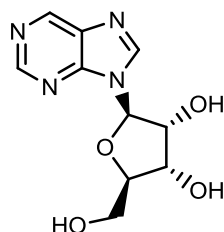
Adenosin (**Obrázek 5**) funguje také jako neuromodulátor a homeostatický regulátor<sup>18</sup>. Jeho fosfátované deriváty, adenosintrifosfát (ATP) a adenosindifosfát (ADP), zaujímají důležité postavení v biochemických procesech, zejména z hlediska přenosu energie. Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) pak vykonává signální funkci.

Guanosin (**Obrázek 5**) má velmi obdobné funkce jako adenosin. Guanosintrifosfát (GTP) je stejně jako ATP zdrojem energie pro metabolické procesy, kdy postupným odbouráváním vznikají di- a monofosfátované deriváty (GDP, GMP). Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) má signální funkci jako tzv. „druhý posel“.



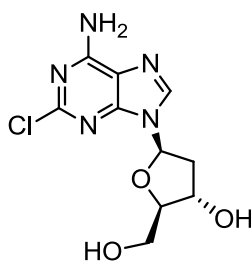
**Obrázek 5:** Základní ribosylované purinové nukleosidy.

Nejjednodušším glykosylovaným purinem je ovšem  $\beta$ -D-ribonukleosid nebularin (**Obrázek 6**). Tento antimetabolit izolovaný z houby *Agaricus nebularis* je vysoce toxický. Jedná se rovněž o velmi účinný inhibitor adenosin deaminázy a ve své trifosfátované formě inhibuje také DNA-polymerázu<sup>19</sup>.



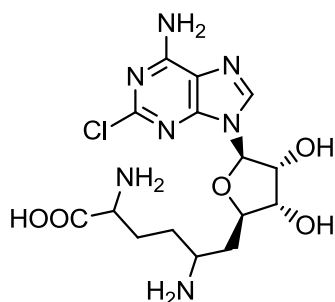
**Obrázek 6:** Strukturální vzorec nebularinu.

Cladribin (**Obrázek 7**), blízký analog 2-deoxyadenosinu, se používá pro léčbu pacientů s trichocelulární leukémií, i jiných neoplasmů, včetně akutní myeloidní leukémie, chronické lymfatické leukémie<sup>17</sup> aj.



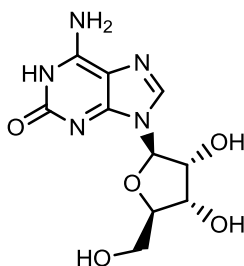
**Obrázek 7:** Cladribin.

Sinefunginy, které byly objeveny v 70. letech minulého století, vykazují silnou aktivitu vůči plísním, parazitům, virům a různým typům nádorových buněk. Ve své struktuře obsahují ornitinový postranní řetězec napojený v poloze 5 deoxyadenosinového zbytku, díky němuž jsou schopny inhibovat methyltransferázové reakce (**Obrázek 8**)<sup>19</sup>.



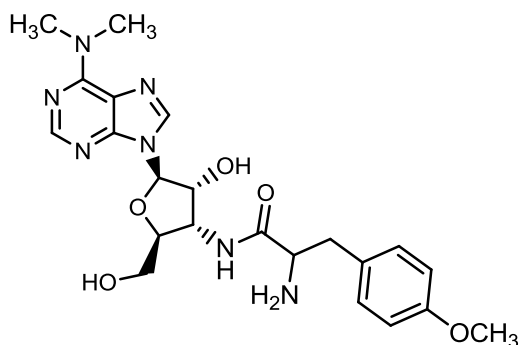
**Obrázek 8:** Strukturní vzorec základního sinefunginu.

Crotonosid (**Obrázek 9**) byl izolován již v roce 1932 z pryšce *Croton tiglium*, později také z motýlů *Prioneris thestylis*. Společně s 2-aminoguanosinem jsou jedinými známými, v přírodě se vyskytujícími, guanosinovými antibiotiky<sup>19</sup>.



**Obrázek 9:** Crotonosid.

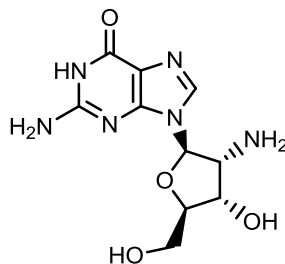
Puromycin (**Obrázek 10**) zajišťuje předčasné uvolnění vznikajícího polypeptidového řetězce napodobením aminoacetylované tRNA a navázáním se na akceptorové místo na ribozomu. Byl získán z bakterie *Streptomyces alboniger* a dlouho používán k vykrmování prasat a kuřat<sup>19</sup>.



**Obrázek 10:** Puromycin.

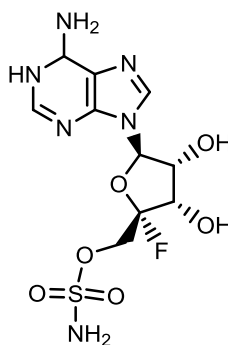
2-Amino-2-deoxyguanosin (**Obrázek 11**) vystupuje buďto v podobě analogu GTP v průběhu iniciace nebo elongace biosyntézy proteinů, nebo bývá přímo zabudován do RNA. Byl izolován z gramnegativní bakterie *Enterobacter cloacea*<sup>19</sup>.





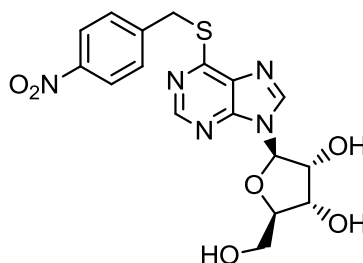
**Obrázek 11:** Strukturní vzorec 2-amino-2-deoxyguanosin.

Nukleocidin (**Obrázek 12**) je jedním z mála v přírodě se vyskytujících ribonukleosidů, jež ve své molekule mají přítomný atom fluoru. Vyskytuje se v bakterii *Streptomyces clavus* a jeho funkce spočívá rovněž v zablokování ribozomů a zastavení syntézy bílkovin<sup>19</sup>.



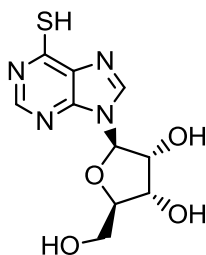
**Obrázek 12:** Nukleocidin.

Transport hydrofilních nukleosidů (např. adenosinu) přes buněčnou membránu může být kontrolován mimo jiné i nukleosidem známým pod označením NBTI (**Obrázek 13**), jehož používání bylo zastaveno kvůli nedostatečné účinnosti a zjištěné toxicitě. Farmakologické vlastnosti byly zlepšeny zavedením objemnějšího substituentu (např. cyklopentanaminu) do polohy C8 purinového kruhu<sup>20</sup>.



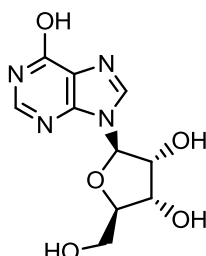
**Obrázek 13:** NBTI.

6-Sulfanylpurinribosid (**Obrázek 14**) má významné antiproliferační účinky a zvyšuje životaschopnost leukocytů postižených promyelodní leukémií<sup>21,22</sup>.



**Obrázek 14:** 6-Sulfanylpurinribosid.

Inosin (**Obrázek 15**) byl poprvé izolován v roce 1968 ze srdečního svalu, má cytotoxické účinky na *Leishmania tropica*, parazita způsobujícího otevřené vředy<sup>23</sup>, inhibuje rovněž enzymatickou aktivitu nukleosidových fosfopolymeráz a inhibuje růst a diferenciaci erythroleukemických buněk<sup>24</sup>.



**Obrázek 15:** Inosin.

### 3.1.2 Glukosylované puriny

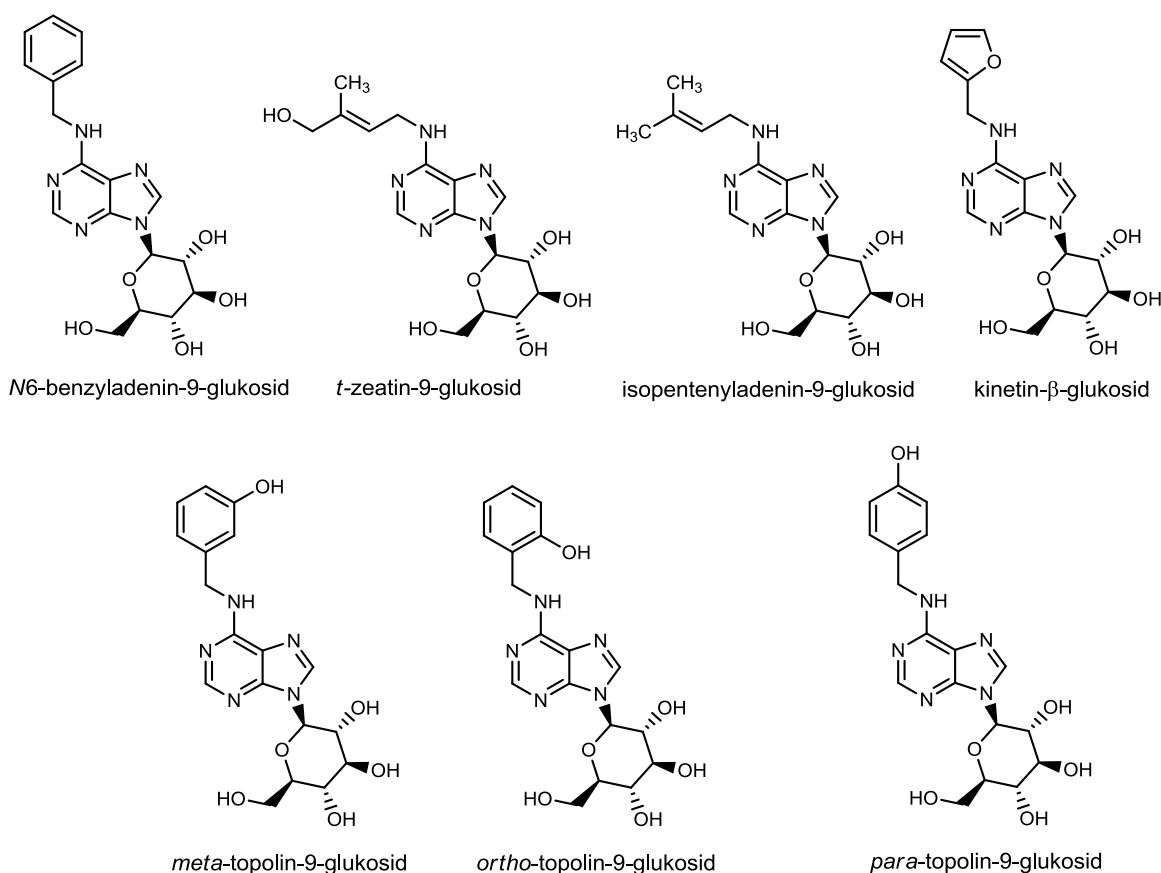
Purinových nukleosidů, v jejichž struktuře je cukerným zbytkem glukosa, bylo ve srovnání s ribosylovanými deriváty dosud připraveno jen několik. Jedná se především o glykosylované deriváty tzv. cytokininů, jejichž základní strukturu tvoří adenin s odlišnými substituenty na aminoskupině v pozici 6 purinového kruhu.

Cytokininy zahrnují skupinu důležitých rostlinných hormonů, které podporují buněčné dělení, diferenciaci buněk, růst bočních pupenů nebo stárnutí listů. Po konjugaci cytokininů s ribosou nebo glukosou přes atom dusíku v poloze 9 dochází k reversibilní inaktivaci cytokininů za vzniku jejich transportní formy<sup>25</sup>.

Protože cytokininy disponují také schopností ovlivňovat diferenciaci lidských buněk, což bylo dokázáno u keratinocytů a u několika typů buněk způsobujících leukémii, byly obdobné testy na cytotoxickou aktivitu provedeny rovněž u jejich glykosylovaných forem.

Výsledky ukázaly, že zatímco glukosylované cytokininy (**Obrázek 16**) vykazují jen omezenou, nebo vůbec žádnou aktivitu vůči těmto buňkám, přítomnost ribosylového zbytku

protinádorové účinky cytokininů výrazně zvyšuje. Ovlivňují například množení různých typů buněk lymfoblastické leukémie a promyelocytické leukémie<sup>25</sup>.



**Obrázek 16:** Příklad glukosylovaných cytokininů.

### 3.2 Nukleofilní aromatické substituce do polohy 6 purinového skeletu

Purinové báze a nukleosidy mívají v poloze 6 purinového skeletu rozmanité substituenty, např. arylové, alkylové, alkenylové či alkynylové skupiny. V následující části této kapitoly bude pojednáno o metodách nukleofilních substitucí, kterými lze takové purinové deriváty syntetizovat.

Cross-couplingové reakce katalyzované obvykle organokovy jsou všestranně využívány nejen v oblasti organických syntéz. Tvorba vazeb C—C se uplatňuje v klíčových stupních syntéz mnoha složitějších molekul. Na **Schématu 9** je znázorněno právě její využití při přípravě výchozího chráněného 6-ethynylpurinnukleosidu z odpovídajícího chráněného 6-chlorpurinnukleosidu, který reagoval s (trimethylsilyl)acetylenem. Meziproduct byl pak desilylován účinkem tetrabutylamonium-fluoridem (TBAF) ve směsi tetrahydrofuranu (THF) s kyselinou octovou (AcOH), aby se předešlo předčasné

deacylaci cukru. K získanému chráněnému 6-ethynylpurinnukleosidu byl přidán diethylamin a za laboratorní teploty byl po 24 hodinách získán požadovaný produkt s výtěžkem 92 % (Schéma 10)<sup>26</sup>.

Schéma 9

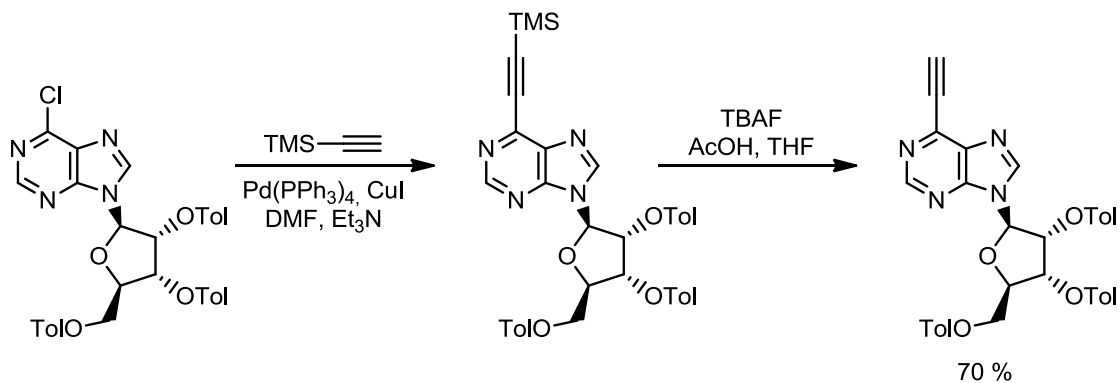
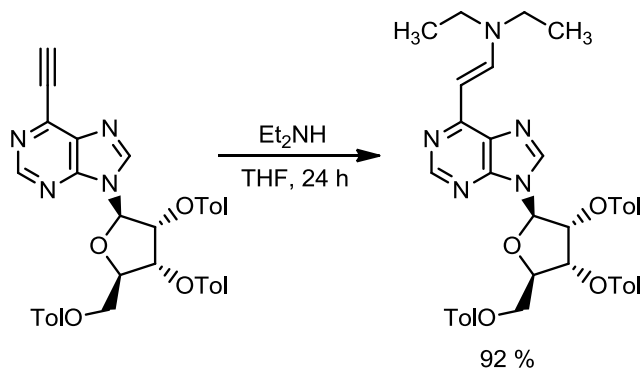
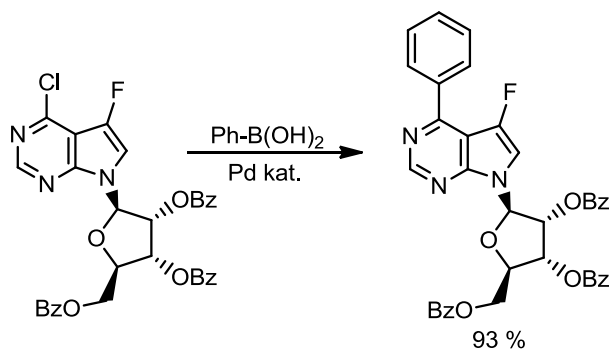


Schéma 10



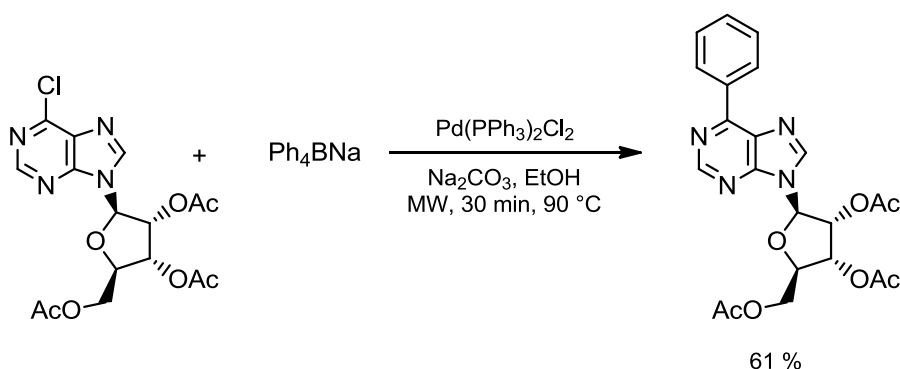
Jak je naznačeno na Schématu 11, účinkem kyseliny fenyloborové na per-*O*-benzoylovaný 6-chlor-7-fluor-7-deazapurinribosid za katalýzy palladia je možné prakticky kvantitativně substituovat atom chloru fenylovou skupinou<sup>27</sup>.

Schéma 11

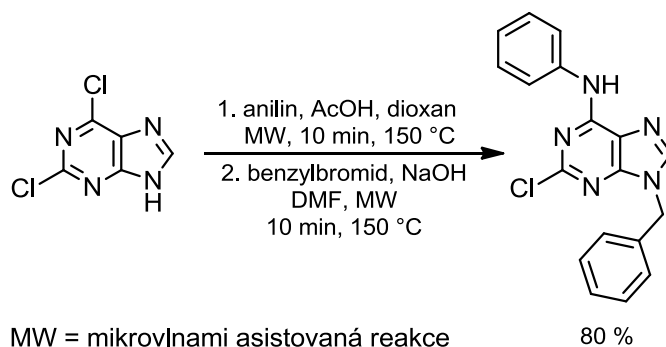


Mikrovlnami asistované reakce už byly použity v řadě organických reakcí, včetně aromatické nukleofilní substituce, cykloadice a organokovových reakcí. Mikrovlny urychlují různé syntetické přeměny, tyto procesy pak zkracují reakční dobu a šetří energii<sup>28</sup>.

Například acetylovaný 6-fenylpurinribosid byl připraven cross-couplingovou reakcí ethanolového roztoku chráněného 6-chlor-9H-purinribosidu s tetrafenylboritanem sodným v mikrovlnném reaktoru (Schéma 12)<sup>29</sup>.

**Schéma 12**

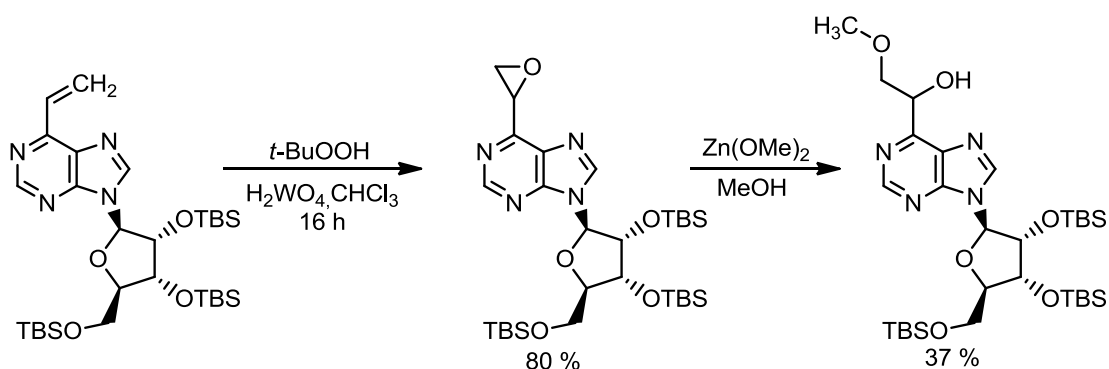
Požadovaný 2,6,9-trisubstituovaný purin byl připraven z 2,6-dichlor-9H-purinu dvoustupňovou syntézou v mikrovlnném reaktoru (Schéma 13). V prvním stupni byl během 10 minut při teplotě 150 °C účinkem anilinu v dioxanu a kyseliny octové substituován atom chloru v poloze C6 purinového kruhu. Následně byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a po odpaření přebytečných těkavých látek byl do surové směsi přidán benzylbromid, hydroxid sodný a dimethylformamid a opět byla směs vystavena identickým reakčním podmínkám jako v předchozím kroku<sup>28</sup>.

**Schéma 13**

Jelikož otevřením epoxidového kruhu lze relativně snadno získat 1,2-disubstituované sloučeniny můžeme je zařadit mezi jedny z nejčastěji používané meziproducty.

Této varianty, pro přípravu konečného produktu uvedeného ve **Schématu 14**, využili také autoři z citované práce<sup>30</sup>, kteří nejprve účinkem *tert*-butylhydroperoxidu v chloroformu za katalýzy wolframové kyseliny při laboratorní teplotě převedli vinylovou skupinu purinnukleosidu na oxiranový kruh, jež byl následně působením methoxidu zinečnatého otevřen.

**Schéma 14**



### 3.3 Deacylace

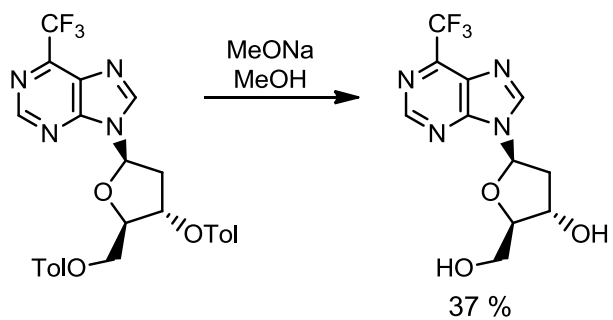
Nejčastěji při přípravě rozmanitých glykosidů, při kterých se využívají jako glykosylové donory různě acylované cukerné deriváty, je posledním krokem syntézy odstranění těchto chránících skupin.

Od vhodných chránících skupin se požaduje relativní stabilita vůči nukleofilům (jako jsou aminy nebo thioly) i za mírných reakčních podmínek, nicméně také to, že po ukončení veškerých požadovaných kroků budou snadno odstranitelné bez destrukce připravené látky.

Deacylace jsou standardně prováděny methoxidem sodným v methanolu nebo v methanolu nasyceném amoniakem. Dále se v běžné praxi ale používají i postupy jako je katalytická hydrogenace palladiem (Pd/C), deacylace účinkem triethylaminu v methanolu.

Názorný příklad deacylace je uveden na **Schématu 15**<sup>31</sup>.

**Schéma 15**



## **II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



## 4 POPIS POUŽITÉHO PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ

Teploty tání ( $t_i$ ) byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

Elementární analýzy (C, H, N) byly prováděny na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental analyzer (Thermo Fischer Scientific).

Retenční faktory ( $R_f$ ) byly určeny TLC analýzou při použití destiček typu Alugram Sil G/UV firmy Macherey-Nagel. Jako mobilní fáze byly použity následující směsi v poměrech (v/v): systém **a**: chloroform/ethyl-acetát (7/3), systém **b**: chloroform/ethanol (19/1), systém **c**: petrolether/ethyl-acetát (5/3), systém **d**: chloroform/ethanol (1/1).

NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 při frekvenci 300,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 75,77 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Jako interní standard bylo používáno rozpouštědlo ( $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{reziduální CHCl}_3) = 7,27$  ppm;  $\delta(\text{reziduální DMSO-}d_5) = 2,50$  ppm;  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,23$  ppm;  $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39,52$  ppm). Při vypisování protonových spekter byly použity následující zkratky: s = singlet, d = dublet, dd = dublet dubletů, ddd = dublet dubletů dubletů.

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet iS10 v podobě KBr tablet. Symboly použité při vypisování spekter značí intenzitu daného absorpčního pásu: w = slabá, m = střední, s = silná; případně jeho šířku: b = široký pás, a jsou uvedeny v  $\text{cm}^{-1}$ .

Hmotnostní spektra byla měřena metodou přímého vstupu buď na hmotnostním spektrometru Shimadzu QP-2010 (DI-EI-MS) nebo na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) vybaveného elektrosprejovým ionizačním zdrojem (ESI-MS). DI-EI-MS: teplotní program: 80 °C/1 min, 40 °C/min zvýšení na teplotu 350 °C, jež byla držena patřičně dlouhou dobu. Iontový zdroj: 200 °C, 70 eV. Při vypisování hmotnostních spekter byly brány v úvahu signály s relativním zastoupením alespoň 5 % (neplatí pro molekulové ionty). ESI-MS: vzorky byly do iontového zdroje přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku 4  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ostatní parametry: napětí na kapiláře:  $\pm 4,2$  kV; teplota sušícího plynu (220 °C); průtok sušícího plynu (6  $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ ); tlak rozprašovacího plynu (55,16 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů. Tandemová hmotnostní spektra byla (po izolaci

požadovanovaného iontu) měřena pomocí kolizí vyvolané disociace (collision-induced dissociation, CID). Jako kolizní plyn bylo použito helium.

Veškeré použité reaktanty, činidla a rozpouštědla, jako např. 2,6-dichlor-9*H*-purin, acetobrom- $\alpha$ -D-glukosa či tetrabutylamonium-bromid, byly zakoupeny z komerčních zdrojů a používány bez jakékoliv dalšího čištění.

## 5 PŘÍPRAVA N<sup>9</sup>-GLUKOSYLOVANÝCH PURINŮ

### 5.1 Glukosylace 2,6-dichlor-9H-purinu za různých reakčních podmínek

#### Postup A:

Směs 2,6-dichlor-9H-purinu (**1**) (188 mg, 1 mmol), acetobrom- $\alpha$ -D-glukosy (**2**) (822 mg, 2 mmol) a uhličitanu cesného (978 mg, 3 mmol) v acetonitrilu (10 cm<sup>3</sup>) byla míchána pod ochrannou dusíkovou atmosférou při laboratorní teplotě, dokud TLC neindikovala spotřebování veškeré výchozí sloučeniny. Po ukončení reakce byla k nažloutlé reakční směsi přidána voda (30 cm<sup>3</sup>), došlo k rozpuštění pevné fáze a vzniklý světle žlutý roztok byl extrahován chloroformem (5 × 20 cm<sup>3</sup>). Spojené organické podíly byly vysušeny nad síranem sodným, zfiltrány a odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO). Surová směs byla chromatografována na sloupci s použitím systému **a**, izolovaný požadovaný produkt byl následně přečištěn krystalizací z diethyletheru.

#### Postup B:

Směs 2,6-dichlor-9H-purinu (189 mg, 1 mmol), acetobrom- $\alpha$ -D-glukosy (617 mg, 1,5 mmol), uhličitanu sodného (159 mg, 1,5 mmol), tetrabutylamonium-bromidu (Bu<sub>4</sub>NBr – katalyzátor fázového přenosu) (129 mg, 0,4 mmol), dichlormethanu (10 cm<sup>3</sup>) a vody (10 cm<sup>3</sup>) byla míchána v uzavřené baňce za laboratorní teploty po dobu pěti dnů. Po ukončení reakce byla vodná fáze oddělena od spodní dichlormethanové a extrahována chloroformem (5 × 20 cm<sup>3</sup>). Spojené organické podíly byly vysušeny nad síranem sodným, přefiltrovány a odpařeny na RVO. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií systémem **a** následovanou krystalizací z diethyletheru.

#### Postup C:

Směs 2,6-dichlor-9H-purinu (189 mg, 1 mmol), acetobrom- $\alpha$ -D-glukosy (616 mg, 1,5 mmol) a uhličitanu cesného (978 mg, 3 mmol) v acetonitrilu (10 cm<sup>3</sup>) byla míchána pod ochrannou dusíkovou atmosférou při laboratorní teplotě 51 h. Po ukončení reakce byla k nažloutlé reakční směsi přidána voda (30 cm<sup>3</sup>), došlo k rozpuštění pevné fáze a vzniklý světle žlutý roztok byl v dělicí nálevce extrahován chloroformem (5 × 20 cm<sup>3</sup>). Spojené organické podíly byly vysušeny nad síranem sodným, zfiltrány a odpařeny na RVO.

Surový produkt byl chromatografován na silikagelovém sloupci s použitím systému **a**. Izolovaný požadovaný produkt byl následně překrytalizován diethyletherem.

### 2,6-Dichlor-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glukopyranosyl)-9*H*-purin (3a)

Čistý produkt byl získán v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžcích 312 mg (61 %, **Postup A**), 307 mg (59 %, **Postup B**) a 241 mg (46 %, **Postup C**);  $t_r = 129\text{--}134\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,44$  (systém **a**),  $R_f = 0,74$  (systém **b**).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,82 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,07 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 4,07 (ddd, 1H,  $J = 12,3$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 4,18 (dd, 1H,  $J = 15,4$  Hz,  $\text{CH}_2$ , Glc); 4,32 (dd, 1H,  $J = 12,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ , Glc); 5,28 (dd, 1H,  $J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 5,46 (dd, 1H,  $J = 18,7$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 5,57 (dd, 1H,  $J = 18,0$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 5,92 (d, 1H,  $J = 9,3$  Hz,  $\text{N}^9\text{CH}$ , Glc); 8,32 (s, 1H,  $\text{NC}^8\text{HN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20,3 ( $\text{CH}_3$ ); 20,6 ( $\text{CH}_3$ ); 20,7 ( $\text{CH}_3$ ); 20,8 ( $\text{CH}_3$ ); 61,6 ( $\text{CH}_2$ , Glc); 67,8 ( $\text{CH}$ , Glc); 70,4 ( $\text{CH}$ , Glc); 72,8 ( $\text{CH}$ , Glc); 75,5 ( $\text{CH}$ , Glc); 80,9 ( $\text{CH}$ , Glc); 130,8 (C); 143,5 ( $\text{C}^8\text{H}$ ); 152,6 (C); 153,1 (C); 153,8 (C); 169,2 (CO); 169,5 (CO); 169,9 (CO); 170,5 (CO) ppm. IČ (KBr): 3519 (m, b), 3124 (w), 2951 (w), 1761 (s), 1594 (s), 1562 (s), 1495 (m), 1432 (m), 1370 (s), 1225 (s), 1170 (m), 1150 (m), 1104 (m), 1063 (m), 1040 (m), 972 (m), 913 (m), 882 (m), 825 (m), 786 (w), 760 (m), 683 (w), 630 (w), 600 (w)  $\text{cm}^{-1}$ . DI-EI-MS (200  $^\circ\text{C}$ , 70 eV): 331 (10), 169 (31), 149 (7), 127 (10), 109 (31), 97 (8), 85 (6), 81 (6), 72 (6), 71 (9), 69 (9), 59 (7), 57 (10), 55 (7), 43 (100), 41 (6)  $m/z$  (%). ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 557 [ $\text{M}(^{35}\text{Cl}_2)+\text{K}$ ] $^+$  (11), 541,1 [ $\text{M}(^{35}\text{Cl}_2)+\text{Na}$ ] $^+$  (100). ESI-MS (neg)  $m/z$  (%): 517,4 [ $\text{M}-\text{H}$ ] (20).

Pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_9$ : vypočtené složení: 43,95 % C; 3,88 % H; 10,79 % N

nalezené složení: 43,65 % C; 3,93 % H; 10,51 % N

### 2-Chlor-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glukopyranosyl)-6-(2,6-dichlor-9*H*-purin-9-yl)-9*H*-purin (3b)

Vedlejší neočekávaný produkt byl vyizolován ve formě bezbarvých krystalků ve výtěžcích 83,5 mg (16 %, **Postup A**) a 57,9 mg (11 %, **Postup C**);  $t_r = 256\text{--}261\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,36$  (systém **a**),  $R_f = 0,70$  (systém **b**).

IČ (KBr): 3464 (w, b), 3127 (w), 2948 (w), 1755 (s), 1610 (s), 1570 (m), 1550 (m), 1492 (m), 1437 (m), 1360 (m), 1299 (w), 1225 (s), 1145 (m), 1100 (m), 1070 (m), 1030

(m), 946 (w), 914 (w), 882 (w), 857 (m), 825 (w), 773 (w), 760 (m), 687 (w), 639 (w)  $\text{cm}^{-1}$ . DI-EI-MS (200 °C, 70 eV): 331 (8), 169 (26), 127 (8), 109 (27), 43 (100)  $m/z$  (%). ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 709  $[\text{M}(^{35}\text{Cl}_2)+\text{K}]^+$  (21), 693,1  $[\text{M}(^{35}\text{Cl}_2)+\text{Na}]^+$  (100).

Pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{N}_8\text{O}_9$ : vypočtené složení: 42,91 % C; 3,15 % H; 16,68 % N

nalezené složení: 42,88 % C; 3,14 % H; 16,41 % N

## 5.2 Nukleofilní aromatická substituce sloučeniny 3a do polohy C6

### 2-Chlor-*N*-fenyl-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glukopyranosyl)-9*H*-purin-6-amin

(4a)

2,6-Dichlor-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glukopyranosyl)-9*H*-purin (3) (519 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn ve směsi dimethylformamidu (3  $\text{cm}^3$ ), triethylaminu (1,1 molární přebytek) a anilinu (1,05 molární přebytek). Roztok byl míchán při teplotě 80–100 °C pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 10 h. Po ukončení reakce bylo k reakční směsi přidáno 50  $\text{cm}^3$  vody za vytvoření bílé sraženiny a vodná vrstva byla v dělicí nálevce extrahována chloroformem (6  $\times$  10  $\text{cm}^3$ ). Spojené organické podíly byly vysušeny nad síranem sodným, zfiltrovány a odpařeny na RVO. Získaný surový produkt byl přečištěn krystalizací z benzenu.

Čistá požadovaná sloučenina byla získána v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžku 259 mg (45 %);  $t_f = 177\text{--}181$  °C;  $R_f = 0,56$  (systém c).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO):  $\delta$  1,74 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,00 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 4,12 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ , Glc); 4,43 (s, 1H,  $\text{CH}$ , Glc); 5,23 (dd, 1H,  $J = 11,1$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 5,65 (dd, 1H,  $J = 11,1$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 5,76 (dd, 1H,  $J = 10,6$  Hz,  $\text{CH}$ , Glc); 6,24 (d, 1H,  $J = 5,2$  Hz,  $\text{N}^9\text{CH}$ , Glc); 7,11 (s, 1H,  $\text{CH}$ , Ph); 7,35 (s, 2H,  $\text{CH}$ , Ph); 7,82 (m, 1H,  $\text{CH}$ , Ph); 8,64 (s, 1H,  $\text{C}^6\text{NH}$ ); 10,36 (s, 1H,  $\text{NC}^8\text{HN}$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO):  $\delta$  20,2 ( $\text{CH}_3$ ); 20,4 ( $\text{CH}_3$ ); 20,6 ( $\text{CH}_3$ ); 20,9 ( $\text{CH}_3$ ); 62,3 ( $\text{CH}$ , Glc); 68,1 ( $\text{CH}$ , Glc); 71,1 ( $\text{CH}$ , Glc); 72,3 ( $\text{CH}$ , Glc); 73,6 ( $\text{CH}$ , Glc); 79,4 ( $\text{CH}$ , Glc); 118,6 ( $\text{C}^6\text{NH}$ ); 121,9 ( $\text{CH}$ , Ph); 124,1 ( $\text{CH}$ , Ph); 128,9 ( $\text{CH}$ , Ph); 138,9 (C); 141,1 (C); 153,3 (C); 152,6 (C); 153,1 (C); 169,2 (CO); 169,6 (CO); 169,8 (CO); 170,4 (CO) ppm. IČ (KBr): 3400 (m), 3105 (w), 2961 (w), 2938 (w), 1758 (s), 1729 (s), 1633 (s), 1587 (s), 1500 (m), 1463 (m), 1369 (m), 1315 (m), 1232 (s), 1146 (w), 1094 (s), 1072 (s), 1043 (s), 979 (w), 942

(w), 911 (w), 792 (l), 783 (w), 754 (w), 687 (m), 584 (w)  $\text{cm}^{-1}$ . DI-EI-MS (200 °C, 70 eV): 245 (6), 169 (20), 127 (7), 109 (26), 43 (100)  $m/z$  (%). ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 1173,3  $[2 \cdot \text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{Na}]^+$  (5), 614,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{K}]^+$  (50), 598,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{Na}]^+$  (100), 576,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}]^+$  (54), 516,2  $[\text{M} - \text{AcO}]^+$  (17). ESI-MS (neg)  $m/z$  (%): 1171,2  $[2 \cdot \text{M}^{(35)\text{Cl}} - 2 \cdot \text{H} + \text{Na}]^-$  (5), 574,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} - \text{H}]^-$  (100).

Pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_9$ : vypočtené složení: 52,13 % C; 4,55 % H; 12,16 % N

nalezené složení: 52,30 % C; 4,77 % H; 12,41 % N

***N*-Benzyl-2-chlor-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-*D*-glukopyranosyl)-9*H*-purin-6-amin  
(4b)**

Sloučenina **3** (519 mg, 1 mmol) byla rozpuštěna ve směsi dimethylsulfoxidu (3  $\text{cm}^3$ ), triethylaminu (1,1 molární přebytek) a benzylaminu (1,05 molární přebytek). Roztok byl míchán při teplotě 80–100 °C pod chlorkalciovým uzávěrem po dobu 10,5 h. V průběhu reakce docházelo ke změnám barvy reakční směsi z bezbarvé přes žlutohnědou na černou. Po ukončení reakce bylo k reakčnímu roztoku přidáno 50  $\text{cm}^3$  vody za vytvoření bílé sraženiny a vodná vrstva byla extrahována chloroformem (9  $\times$  10  $\text{cm}^3$ ). Spojené organické vrstvy byly vysušeny nad síranem sodným, zfiltrvány a odpařeny na RVO. Získaný surový produkt byl nejprve přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s použitím systému **c** a izolovaná látka byla následně překrystalizována z diethyletheru.

Očekávaný produkt byl získán v podobě bezbarvého krystalického prášku ve výtěžku 237 mg (40 %);  $t_f = 105\text{--}116$  °C;  $R_f = 0,31$  (systém **c**).

IČ (KBr): 3384 (m, b), 2942 (w), 1755 (s), 1625 (s), 1533 (w), 1484 (w), 1453 (l), 1428 (w), 1365 (m), 1300 (m), 1234 (s), 1061 (m, b), 930 (w), 832 (w), 735 (w), 703 (w)  $\text{cm}^{-1}$ . DI-EI-MS (200 °C, 70 eV): 261 (6), 260 (8), 259 (17), 258 (6), 169 (40), 127 (11), 109 (35), 106 (11), 91 (25), 43 (100)  $m/z$  (%). ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 628,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{K}]^+$  (17), 612,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{Na}]^+$  (54), 590,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} + \text{H}]^+$  (100). ESI-MS (neg)  $m/z$  (%): 588,2  $[\text{M}^{(35)\text{Cl}} - \text{H}]^-$  (100).

Pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_5\text{O}_9$ : vypočtené složení: 52,93 % C; 4,78 % H; 11,87 % N

nalezené složení: 53,19 % C; 4,77 % H; 11,66 % N

### 5.3 Deacetylace připravených sloučenin

#### 2-Chlor-9-(-D-glukopyranosyl)-6-methoxy-9H-purin (5)

Směs sloučeniny **3** (260 mg, 0,5 mmol), triethylaminu (0,35 cm<sup>3</sup>, 2,5 mmol) a methanolu (5 cm<sup>3</sup>) byla refluxována 4 h při teplotě 70–80 °C. Po ukončení reakce byl surový produkt odpařen do sucha na RVO, zvážen, za horka rozpuštěn v ethanolu a ponechán spontánně krystalizovat.

Předpokládaný produkt byl vyizolován v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžku 55 mg (31 %);  $t_t = 226\text{--}232$  °C;  $R_f = 0,57$  (systém **d**).

IČ (KBr): 3400 (s, b), 2990 (m), 2928 (w), 2900 (w), 1849 (w, b), 1600 (s), 1481 (s), 1397 (s), 1316 (s, b), 1204 (s), 1200 (w), 1160 (w), 1071 (s, b), 934 (m), 905 (m) cm<sup>-1</sup>. ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 385,1 [M(<sup>35</sup>Cl)+K]<sup>+</sup> (21), 369,1 [M(<sup>35</sup>Cl)+Na]<sup>+</sup> (100), 347,2 [M(<sup>35</sup>Cl)+H]<sup>+</sup> (82). ESI-MS (neg)  $m/z$  (%): 345,1 [M(<sup>35</sup>Cl)-H]<sup>-</sup> (8), 691,1 [2·M(<sup>35</sup>Cl)-H]<sup>-</sup> (41).

Pro C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: vypočtené složení: 41,57 % C; 4,36 % H; 16,16 % N

nalezené složení: 41,64 % C; 4,43 % H; 15,96 % N

#### 2-Chlor-N-fenyl-9-(-D-glukopyranosyl)-9H-purin-6-amin (6)

Titulní látka byla připravena reakcí sloučeniny **4a** (173 mg, 0,3 mmol) a triethylaminu (0,21 cm<sup>3</sup>, 1,5 mmol) v methanolu (5 cm<sup>3</sup>), která byla refluxována při 70–80 °C po dobu 1,5 h. Po ukončení reakce byl surový produkt odpařen do sucha na RVO, zvážen, za horka rozpuštěn v ethanolu a ponechán spontánně krystalizovat z bezvodého diethyletheru.

Čistý produkt byl získán v podobě bezbarvých krystalků ve výtěžku 112 mg (80 %);  $t_t = 272\text{--}283$  °C;  $R_f = 0,67$  (systém **d**).

IČ (KBr): 3320 (s, b), 3316 (s, b), 1642 (s), 1585 (s), 1500 (s), 1357 (s), 1307 (s), 1223 (m), 1166 (m), 1090 (s, b), 1052 (s, b), 949 (w), 816 (w), 751 (m), 686 (w), 625 (w) cm<sup>-1</sup>. ESI-MS (poz)  $m/z$  (%): 446,1 [M(<sup>35</sup>Cl)+K]<sup>+</sup> (12), 430,2 [M(<sup>35</sup>Cl)+Na]<sup>+</sup> (43), 408,2 [M(<sup>35</sup>Cl)+H]<sup>+</sup> (100). ESI-MS (neg)  $m/z$  (%): 406,1 [M(<sup>35</sup>Cl)-H]<sup>-</sup> (100).

Pro C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: vypočtené složení: 50,07 % C; 4,45 % H; 17,17 % N

nalezené složení: 49,93 % C; 4,59 % H; 16,93 % N

### **III. VÝSLEDKY A DISKUZE**



## 6 ORGANICKÉ SYNTÉZY A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

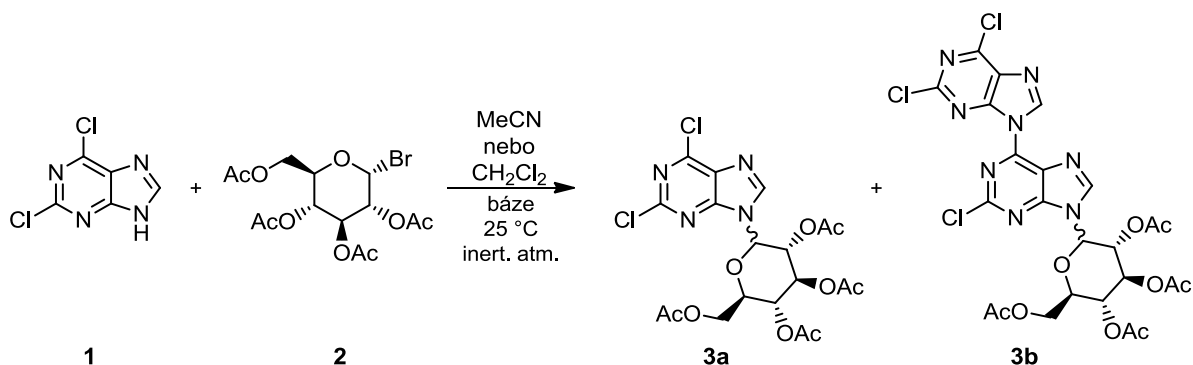
Cílem předložené diplomové práce bylo provést sérii glykosylačních reakcí 2,6-dichlor-9*H*-purinu za různých podmínek, na základě získaných výsledků měly být vyhodnoceny nejvhodnější podmínky (výtěžek, reakční doba, ekonomická náročnost) pro získání požadovaného produktu. Tyto glykosylace, dále nazývané jako glukosylace, jelikož se jednalo o zavádění konkrétní glukosylové složky, byly provedeny modifikací Koenigsovy-Knorrovy metody, a připravená glukosylovaná sloučenina pak sloužila jako výchozí reaktant v dalších syntézách pro přípravu jejích derivátů. Závěrečným krokem byly deacetylace předešle připravených sloučenin.

U syntetizovaných sloučenin nebyla dosud určena konfigurace na anomerním atomu uhlíku, ale dle známého mechanismu Koenigsovy-Knorrovy metody by výsledný glukosid měl mít  $\beta$ -anomerní konfiguraci. Experimentálně je ji možné určit změřením 2D-NMR (NOESY), na němž by měla být zřejmá korelace v prostoru mezi vodíky na atomech uhlíku C1 a C5 glukosylového zbytku, pokud by se jednalo o  $\beta$ -anomer. V případě  $\alpha$ -anomeru by k této korelaci dojít nemělo.

### 6.1 Glukosylace 2,6-dichlor-9*H*-purinu za různých reakčních podmínek

Dle obecného **Schématu 16** byla provedena série celkem čtyř glukosylací (**Tabulka 1**), kdy na atom dusíku v poloze 9 sloučeniny **1** byl vázán cukerný zbytek z glukosylového donoru, kterým byl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glukopyranosylbromid (**2**), v cukerné chemii triviálně nazývaný acetobromglukosa.

**Schéma 16**



Produktem těchto reakcí byl 2,6-dichlor-9-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glukopyranosyl)-9*H*-purin (**3a**), který byl v čisté podobě izolován ze surových směsí sloupcovou chromatografií a přečištěn krystalizací. Jeho struktura byla následně potvrzena běžnými metodami strukturní analýzy (např. IR, EI-MS, ESI-MS či NMR).

**Tabulka 1:** Reakční podmínky a výtěžky provedených glukosylací.

Experiment	2* [ekviv.]	Báze	Rozpouštědlo	Reakční doba [h]	Výtěžek** [%]	
					3a	3b
<u>1</u>	2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeCN	26	61	16
<u>2</u>	2	Ag <sub>2</sub> O	MeCN	214	0	0
<u>3</u>	1,5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	119	59	0
<u>4</u>	1,5	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	MeCN	51	43	11

\* (ekviv.)/mmol výchozí látky **1**

\*\* uvedené výtěžky odpovídají získaným chromatografickým frakcím

Experimenty **1**, **2** a **4** byly provedeny pod ochranou dusíkovou atmosférou v acetonitrilu, zatímco čtvrtý z nich byl proveden ve dvoufázové směsi dichlormethan/voda (1/1, v/v). Všechny reakce byly uskutečňovány za laboratorní teploty, ale vzájemně se lišily buďto v typu použité báze, nebo v látkovém množství reagujícího cukru.

V první reakci byl použit 2,0 molární přebytek acetobromglukosy a jako báze uhličitán cesný. Požadovaná sloučenina **3a** byla izolována ve výtěžku 61 % vedle neočekávaného produktu **3b**, který byl získán ve výtěžku 16 %. Lze se domnívat, že by se mohlo jednat o látku, která ve své struktuře obsahuje dva purinové skelety a jednu cukernou složku. K tomuto názoru nás vedou výsledky ESI-MS spektrometrie a elementární analýzy. Pozice vzájemného navázání strukturních podjednotek bude předmětem budoucích NMR experimentů, ale předběžně by se mohlo jednat o strukturu již uvedenou ve **Schématu 16**. Purinové skelety jsou pravděpodobně vzájemně spojeny v poloze C6 jedné jednotky a N9 druhé. Glukosyl je nejspíš v poloze N9 prvního purinu.

Při glukosylaci **2** byl jako báze použit oxid stříbrný, a to v 2,0 molárním přebytku. Jednalo se o velmi složitou směs, kterou se nepodařilo separovat sloupcovou chromatografií (ani opakovaným dělením) na čistá chemická individua a ta následně charakterizovat.

Třetí reakce probíhala ve dvoufázové směsi s tetrabutylamonium-bromidem jako katalyzátorem fázového přenosu v systému dichlormethan/voda. Jako báze zde vystupoval

uhlíčitan sodný a cukerná složka byla použita v 1,5 molárním přebytku. Výtěžek této reakce činí 59 %, avšak celková reakční doba byla poměrně dlouhá, asi pět dnů. To může být způsobeno omezenou rozpustností organických sloučenin ve vodě nebo naopak nízkou rozpustností jednotlivých reaktantů v organických rozpouštědlech. Z těchto důvodů může reakce probíhat relativně dlouhou dobu, a to i přes použití transferového katalyzátoru.

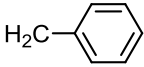
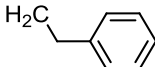
Poslední zkoušená možnost glukosylace (**4**) jak připravit požadovanou látku představovalo použití již ověřené báze, tedy uhlíčitanu cesného, tentokrát ale s nižším přebytkem acetobromglukosy, a to 1,5 molárním. Došlo sice ke zkrácení reakčního času, nicméně v porovnání s glukosylací **1** byla reakční doba stále dvojnásobná a také konečný výtěžek produktu byl přibližně o 20 % nižší. I při této reakci byl vyizolován dříve zmíněný a blíže neurčený vedlejší produkt **3b**, a to ve výtěžku 11 %.

Není možné říci, že by některá z metod byla výrazně lepší než ostatní. U všech, kromě reakce **2**, bylo dosaženo relativně dobrých výtěžků. Přestože uhlíčitan cesný nepatří mezi nejlevnější báze, vzhledem k nejkratší reakční době a jednoduššímu zpracování, ve srovnání s reakcí prováděnou ve dvoufázové směsi, byla pro přípravu většího množství sloučeniny **3a** vybrána právě reakce **1**.

## 6.2 Nukleofilní aromatická substituce sloučeniny **3a** do polohy C6

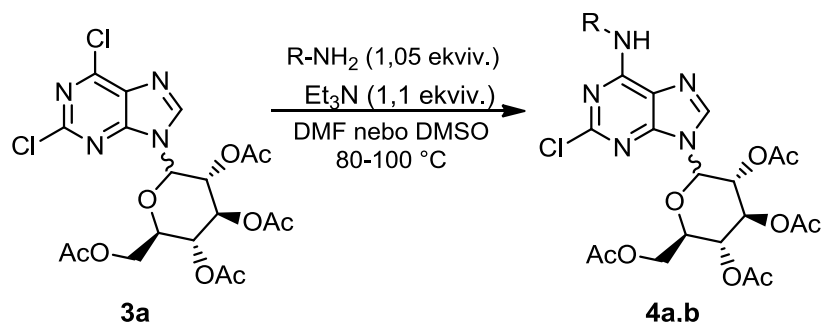
Dalším krokem bylo zavedení vybraných primárních aminů uvedených v **Tabulce 2** do polohy 6 purinového skeletu sloučeniny **3a**.

**Tabulka 2:** Nukleofilní substituce vybranými primárními aminy.

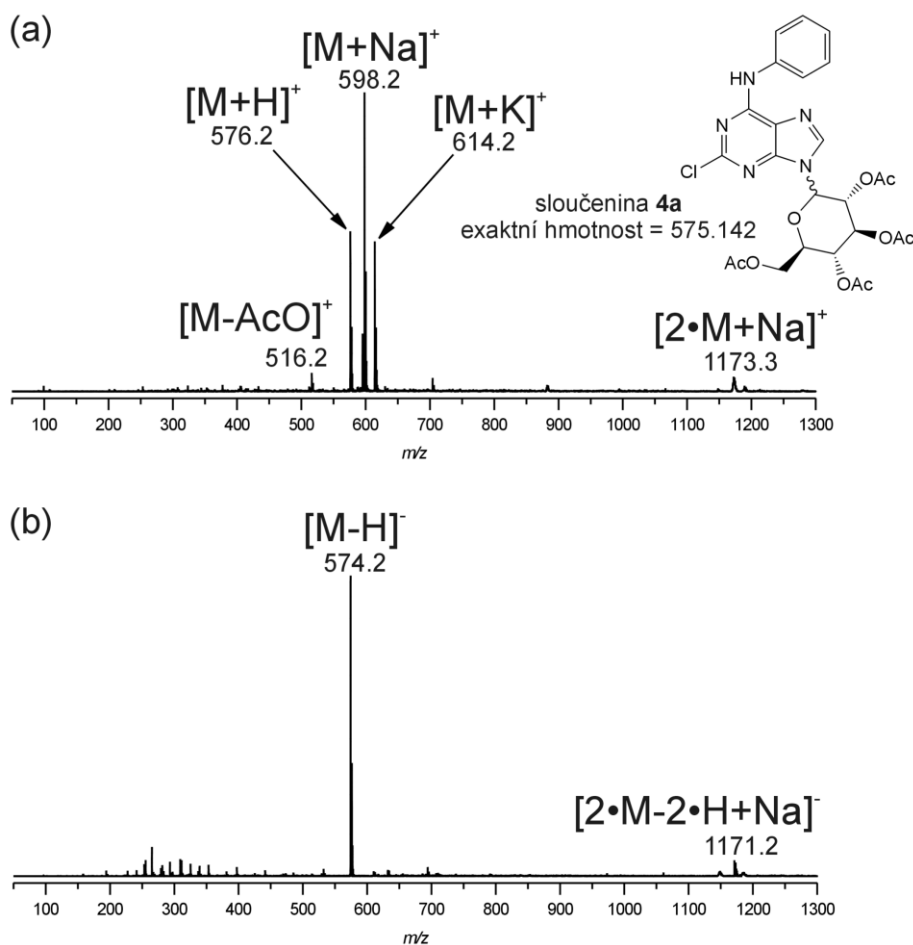
Produkt	R	Reakční doba [h]	Výtěžek [%]
<b>4a</b>		10,5	45
<b>4b</b>		10	41

Sloučenina **4a** je produktem reakce výchozího acetyloxyglukosylpurinu **3a** s anilinem v DMF, zatímco sloučenina **4b** vznikla reakcí analogické výchozí látky s benzylaminem v DMSO. Obě reakční směsi byly refluxovány za přítomnosti 1,05 molárního přebytku obou primárních aminů a 1,1 molární přebytku triethylaminu (**Schéma 17**).

Schéma 17



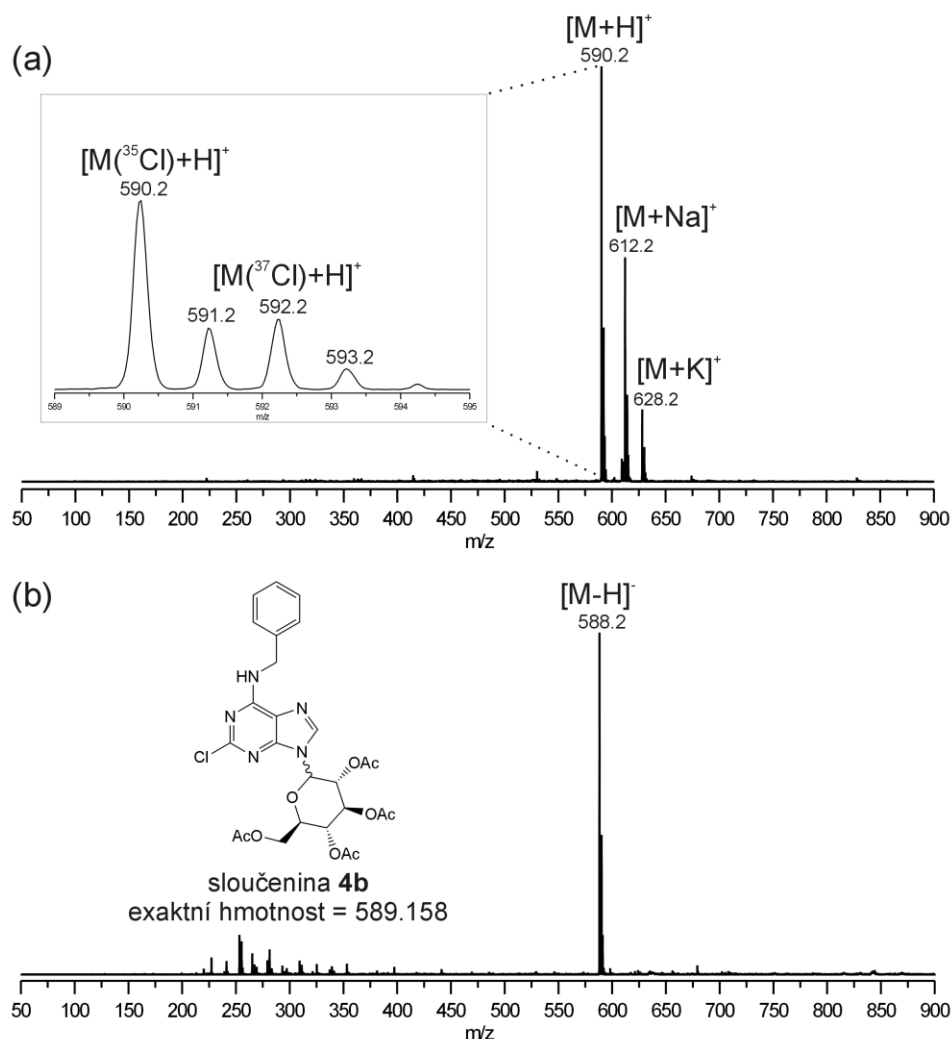
Zatímco při reakci sloučeniny **3a** s anilinem, jakožto aromatickým aminem, nelze považovat reakční dobu za nikterak dlouhou, u reakce této látky s benzylaminem, jako silnějším nukleofilem, bylo možné očekávat reakční dobu kratší, než jaká byla ve skutečnosti pozorována. Struktury obou produktů byly ověřeny prostřednictvím běžně používaných metod strukturní analýzy. Na **Obrázku 17** je uvedeno spektrum z analýzy ESI-MS jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu.



**Obrázek 17:** ESI-MS spektra sloučeniny **4a**; (a) +MS, (b) -MS.

V pozitivu je dominantním signálem sodný adukt  $[M+Na]^+$ , který je doprovázen dalšími dvěma významnými signály, a sice protonovaným molekulovým iontem  $[M+H]^+$  a draselným aduktem molekulového iontu  $[M+K]^+$ . Ve spektru prvního řádu kladně nabitých iontů byly dále pozorovány dva minoritní signály. Jedním z nich byl sodný adukt dimeru molekuly  $[2\cdot M+Na]^+$  a druhým pak iont  $[M-AcO]^+$  vznikající negativní ztrátou acetylu z molekuly studované látky již v důsledku ionizačního procesu. V negativním spektru prvního řádu byl jako dominantní signál pozorován deprotonovaný molekulový iont  $[M-H]^-$ , který byl doprovázen signálem, jehož hodnota  $m/z$  odpovídá sodnému aduktu dimeru molekuly postrádající dva atomy vodíku  $[2\cdot M-2\cdot H+Na]^-$ .

Na **Obrázku 18** je prezentováno další ESI-MS spektrum, tentokrát sloučeniny **4b**, rovněž v pozitivním i negativním skenovacím módu.



**Obrázek 18:** ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **4b**. (a) +MS s detailem izotopického klastru protonovaného molekulového iontu; (b) -MS.

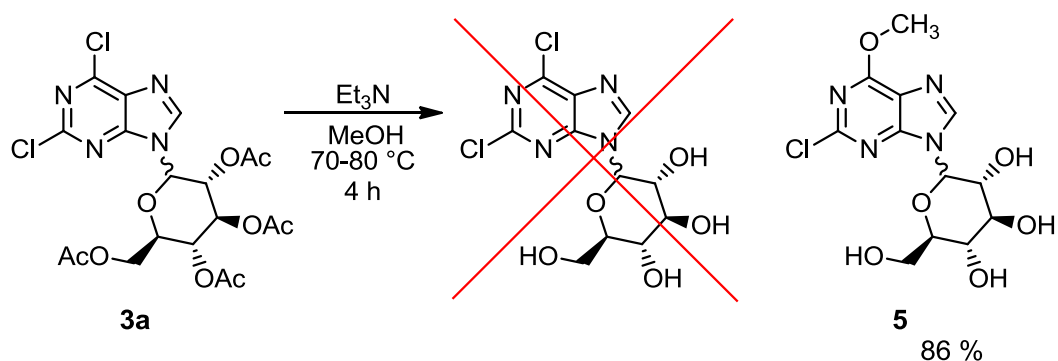
V obou spektrech prvního řádu byl pozorován jako dominantní signál o  $m/z$  odpovídající molekulovému iontu, v pozitivu v jeho protonované formě  $[M+H]^+$ , v negativu naopak v podobě deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . V pozitivním módu byl pseudomolekulární iont doprovázen dalšími dvěma signály, a sice sodným  $[M+Na]^+$  a draselným  $[M+K]^+$  aduktem molekulového iontu. Na **Obrázku 18a** je dále uveden detail iontu  $[M+H]^+$ , ve kterém lze sledovat dva významné signály o  $m/z$  590 a 592 náležící izotopům  $^{35}\text{Cl}$  a  $^{37}\text{Cl}$ . Přibližný poměr zmíněných signálů (3:1) je typický pro sloučeniny obsahující ve své molekule jeden atom chloru.

### 6.3 Deacetylace připravených sloučenin

Jak už bylo dříve řečeno, finálním krokem reakcí s chráněnými cukernými deriváty bývají deacetylace.

Pro odstranění chránících acetylových skupin ze získaných produktů byla zvolena metoda s použitím triethylaminu v methanolu. Pro ověření reakčních podmínek byla nejprve provedena zkušební deacetylace sloučeniny **3a** (**Schéma 18**).

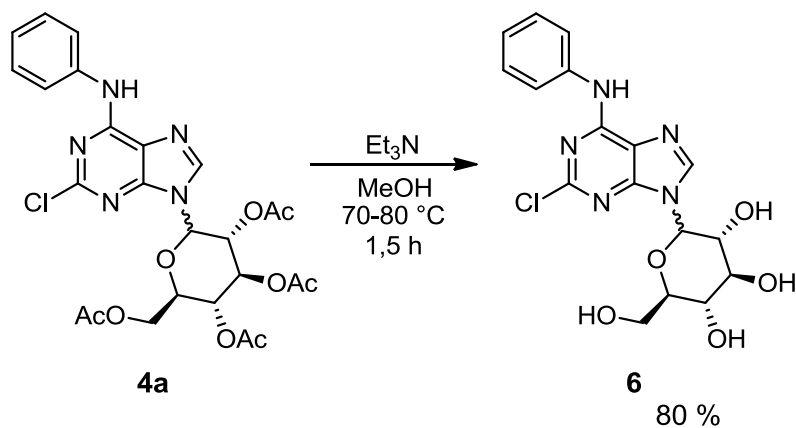
**Schéma 18**



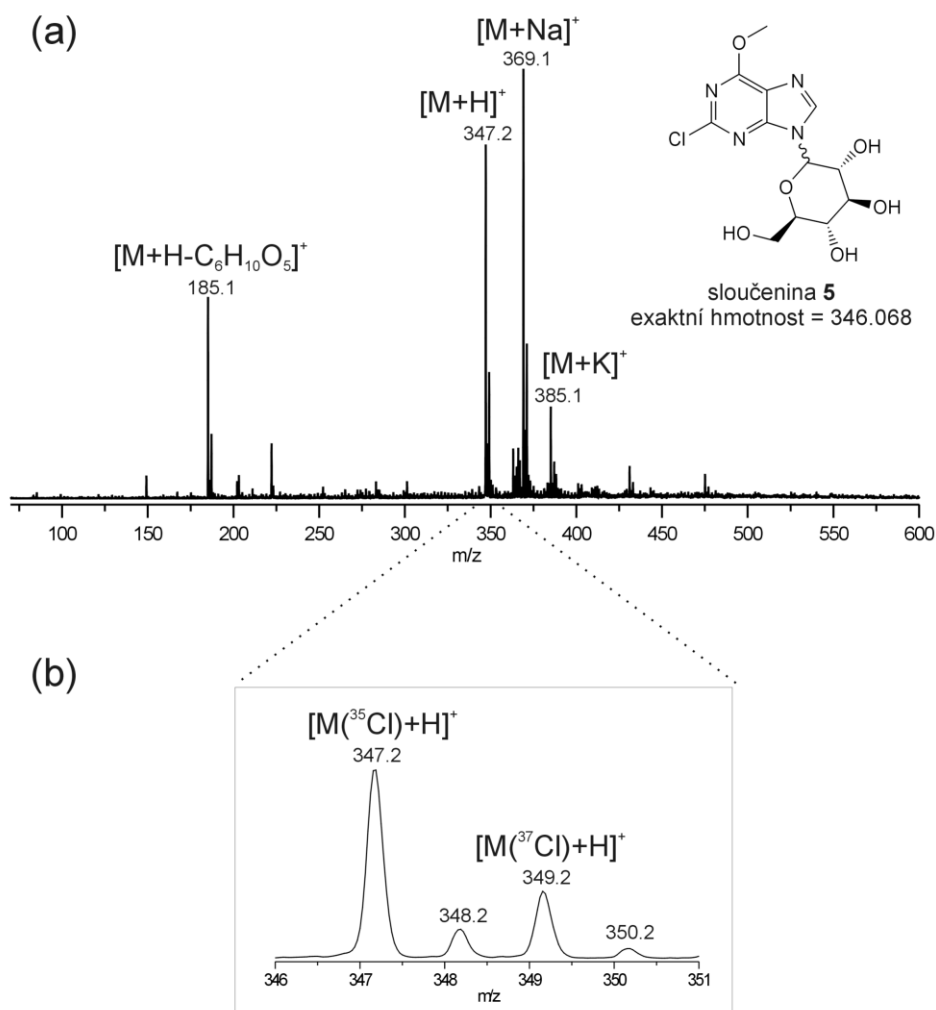
Konverze sloučeniny **3a** na deacetylovaný produkt byla účinkem triethylaminu prakticky kvantitativní, nicméně v průběhu reakce nastala nežádoucí substituce atomu chloru v pozici 6 purinového kruhu methoxylovou skupinou, čímž vznikl 2-chlor-9-(-D-glukopyranosyl)-6-methoxy-9H-purin (**5**).

Ke vzniku neočekávaného methoxylového derivátu by nedošlo za předpokladu, že by na atomu uhlíku C6 purinového kruhu byl navázán nereaktivní substituent. Tento předpoklad byl potvrzen následující deacetylací, které byla podrobena sloučenina **4a** (**Schéma 19**).

Schéma 19



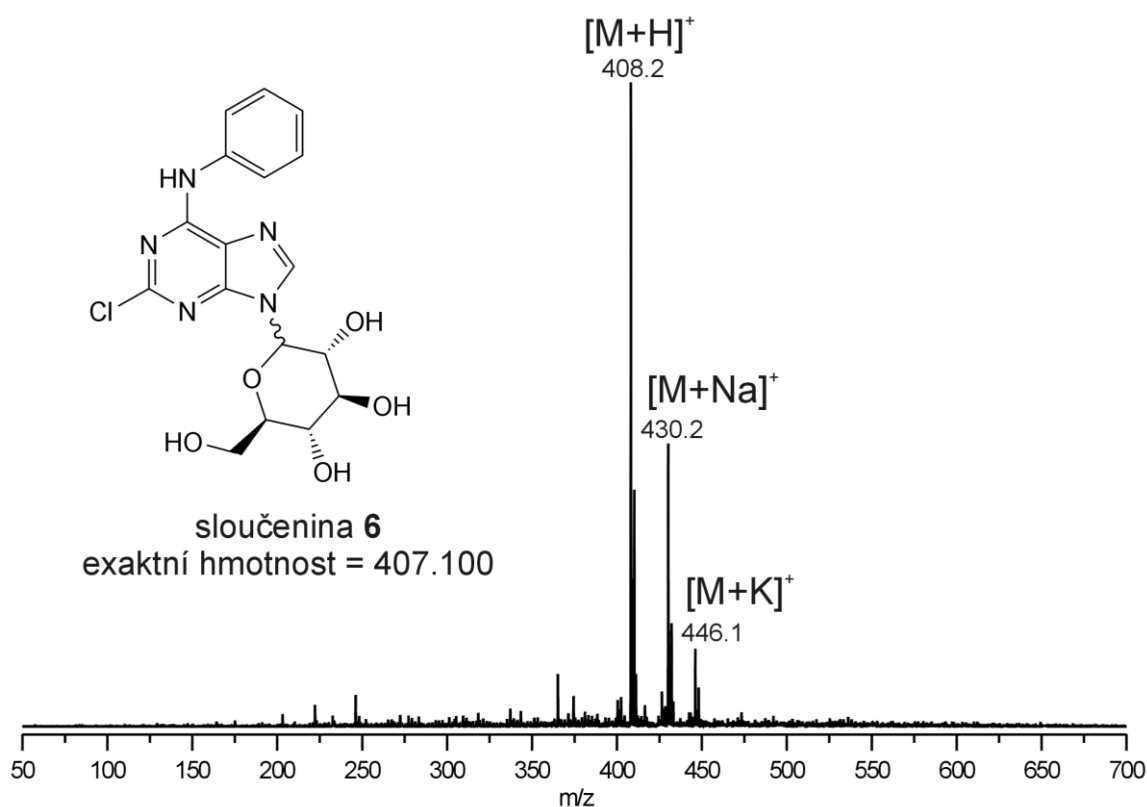
Struktury obou deacetylovaných sloučenin **5** a **6** byly dokázány prostřednictvím ESI-MS analýz (**Obrázky 19 a 20**).



**Obrázek 19:** ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **5**. (a) +MS;

(b) detail izotopického klastru protonovaného molekulového iontu.

Ve spektru prvního řádu sloučeniny **5** byly pozorovány celkem čtyři významné signály, přičemž molekulová hmotnost připravené sloučeniny (346  $m/z$ ), určená na základě pozorovaných signálů v MS spektru prvního řádu, byla o 4  $m/z$  nižší než molekulová hmotnost očekávaného produktu (350  $m/z$ ). Při detailnějším pohledu na vzhled izotopického klastru všech pozorovaných signálů (detail signálu  $[M+H]^+$  je uveden na **Obrázku 19b**) bylo zřejmé, že se jedná o sloučeninu obsahující jeden a nikoliv dva atomy chloru v molekule. Z reakčních podmínek uvedených na **Schématu 19** lze usoudit, že v průběhu syntézy došlo k nahrazení atomu chloru v poloze C6 (ve srovnání s atomem chloru na C2 je atom chloru na C6 reaktivnější) methoxy skupinou, za vzniku sloučeniny **5**. V ESI-MS spektru této látky (**Obrázek 19a**) tak byly pozorovány signály o  $m/z$  347, 369 a 385, které byly později přiřazeny iontům  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  a  $[M+K]^+$ . Posledním pozorovaným signálem ve spektru prvního řádu sloučeniny **5** byl iont o  $m/z$  185 vznikající neutrální ztrátou cukerné složky z iontu  $[M+H]^+$  v průběhu ionizačního procesu.



**Obrázek 20:** ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **6**.

Na **Obrázku 20** je uvedeno ESI-MS spektrum sloučeniny **6** naměřené v pozitivním módu. Dominantním signálem je v tomto případě protonovaný molekulový iont  $[M+H]^+$ , doprovázený jeho sodným  $[M+Na]^+$  a draselným  $[M+K]^+$  aduktem.



## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala syntézou *N*9-glukosylovaných purinů. Byla provedena série glykosylačních reakcí založených na modifikaci Koenigsovy-Knorrovy metody, které se vzájemně lišily v typu použité báze nebo v látkovém množství reagujícího cukru a jejíž podstatou bylo navázat glukosylový zbytek do polohy 9 purinového kruhu za vzniku sloučeniny **3a**. Tento požadovaný produkt byl získán ve všech reakcích, pouze při reakci, kde jako báze vystupoval oxid stříbrný, vznikla velmi složitá směs produktů, které nebylo možné od sebe separovat. Pro zopakování reakce s cílem připravit větší množství sloučeniny **3a** byl jako báze vybrán uhličitan cesný jak z ekonomických důvodů, protože je stále levnější než katalyzátor fázového přenosu, tak z důvodu kratší reakční doby. Zajímavostí v případě této báze je, že pouze při reakcích, v nichž byla použita, docházelo k tvorbě vedlejšího produktu **3b**, který ve své molekule nese dva purinové skelety a jednu glukosylovou složku. Tato sloučenina bude v budoucnu předložena k dalšímu zkoumání.

U sloučeniny **3a** byl dále úspěšně substituován atom chloru v poloze C6 primárními aminy, anilinem a benzylaminem, čímž byly syntetizovány sloučeniny **4a** a **4b**.

Posledním krokem provedených syntéz bylo odstranění chránících skupin z připravených sloučenin. Pro ověření zvolených podmínek byl nejprve deacetylován produkt **3a**. I když v průběhu reakce došlo k nežádoucí konverzi atomu chloru v poloze C6 na methoxylovou skupinu, byly z glukosylového zbytku chránící skupiny odstraněny a tudíž lze tento test považovat za úspěšný. Deacetylace sloučeniny **4a** pak už proběhla bez problémů, jelikož poloha C6 byla již blokována objemnějším substituentem.

Struktury všech připravených látek byly potvrzeny prostřednictvím metod strukturních analýz, jejichž výsledky byly v práci prezentovány.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> STANĚK, Jaroslav. Monosacharidy. 1. vyd. Praha: Nakl. Československé akademie věd, 1960, 519 s.
- <sup>2</sup> ČOPÍKOVÁ, Jana. Chemie a analytika sacharidů. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 104 s. ISBN 80-708-0306-1.
- <sup>3</sup> ČERNÝ, M., TRNKA, T., BUDĚŠÍNSKÝ, M. Sacharidy. 1. vyd. Praha: Česká společnost chemická, 2010, 178 s. Chemické listy. ISBN 978-80-86238-81-4.
- <sup>4</sup> KOZLOWSKI, T. T., PALLARDY, S. G. *Physiology of Woody Plants*. 2<sup>nd</sup> Ed. **1997**. p. 159–173.
- <sup>5</sup> TOSHIMA, K. *Glycoscience: Glycosyl Halides*. Berlin: SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG, **2008**. 429 p. ISBN 978-3-540-36154-1.
- <sup>6</sup> LEROUX, J., PERLIN, A. S. Synthesis of glycosylhalides and glycosides via 1-O-sulfonyl derivatives. *Carbohydr. Res.* **1978**, 67, 163-178.
- <sup>7</sup> KOVÁČ, J., KRUTOŠÍKOVÁ, A. *Chémia heterocyklických zlúčenin: Vysokoškol. príručka pre vys. šk.* Vyd. 1. Bratislava, 1982.
- <sup>8</sup> DEMCHENKO, A. V. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**. 28 p. ISBN: 978-3-527-31780-6.
- <sup>9</sup> ZHONG, M., NOWAK, I., ROBINS, M. J. 6-(2-Alkylimidazol-1-yl)purines Undergo Regiospecific Glycosylation at N9. *Organic Letters*. **2005**, 7, 4601-4603.
- <sup>10</sup> ZHONG, M., NOWAK, I., CANNON, J. F., ROBINS, M. J. Structure and Synthesis of 6-(Substituted-imidazol-1-yl)purines: Versatile Substrates for Regiospecific Alkylation and Glycosylation at N9. *J. Org. Chem.* **2006**, vol. 71, p. 4216–4221.
- <sup>11</sup> SISIDO, K. *J. Soc. Chem. Ind. Japan*. **1936**, vol. 39, p. 217.
- <sup>12</sup> HANESSIAN, Stephen. *Preparative carbohydrate chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996, 648 p. ISBN 08-247-9802-3.
- <sup>13</sup> FISCHER, E., HELFERICH, B. Synthetische Glucoside der Purine. *Chem. Ber.* **1914**, vol. 47, p. 210–235.

- <sup>14</sup> MIYAKI, M., SHIMIZU, B. N $\rightarrow$ N Alkyl and Glycosyl Migration of Purines and Pyrimidines. III. N $\rightarrow$ N Alkyl and Glycosyl Migration of Purines Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, vol. 18, p. 1446.
- <sup>15</sup> NOVÁK, J. K., ŠORM, F. *Collect. Czech Chem. Commun.* **1962**, vol. 27, p. 902.
- <sup>16</sup> KAZIMIERCZUK, Z., COTTAM, H. B., REVANKAR, G. R., ROBINS, R. K. Synthesis of 2-Deoxytubercidin, 2-Deoxyadenosine and Related 2-Deoxynucleosides via a Novel Direct Stereospecific Sodium Salt Glycosylation Procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, vol. 106, p. 6379.
- <sup>17</sup> ZHONG, M., NOWAK, I., ROBINS, M. J. Regiospecific and Highly Stereoselective Coupling of 6-(Substituted-imidazol-1-yl)purines with 2-Deoxy-3,5-di-*O*-(*p*-toluoyl)-*r*-*D*-*erythro*-pentofuranosyl Chloride. Sodium-Salt Glycosylation in Binary Solvent Mixtures: Improved Synthesis of Cladribine. *J. Org. Chem.* **2006**, vol. 71, p. 7773–7779.
- <sup>18</sup> HASKÓ, G., LINDEN, J., CRONSTEIN, B., PACHER, P. Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, vol. 9, p. 759–770.
- <sup>19</sup> ROSEMEYER, H. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chemistry & Biodiversity.* **2004**, vol. 1, p. 361–401.
- <sup>20</sup> LEGRAVEREND, M., GRIERSON, D. S. The Purines: Potent and Versatile Small Molecule Inhibitors and Modulators of Key Biological Targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2006**, vol. 16, p. 3987–4006.
- <sup>21</sup> IWAMOTO, R., ACTON, E. M., GOODMAN, L. Potential Anticancer Agents. LXXXI. 2'-Deoxyribofuranosides of 6-Mercaptopurine and Related Purines. *J. Org. Chem.* **1962**, vol. 27, p. 3949–3953.
- <sup>22</sup> MIRON, T., ARDITTI, F., RABINKOV, A., MIRELMAN, D., WILCHEK, M., KONSTANTINOVSKI, L., BERREBI, A. Novel Derivatives of 6-Mercaptopurine: Synthesis, Characterization and Antiproliferative Activities of *S*-Allylthio-mercaptopurines. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2009**, vol. 44, p. 541–550.
- <sup>23</sup> SHIN, I., WATAYA, Y. Characterization of Nucleoside Phosphotransferase from *Leishmania Tropica*. *Nucleosides & Nucleotides.* **1995**, vol. 14, p.13–22.

- <sup>24</sup> LIN, T., CHENG, J., ISHIGURO, K., SARTORELLI, A. C. Purine and 8-Substituted Purine Arabinofuranosyl and Ribofuranosyl Nucleoside Derivatives as Potential Inducers of the Differentiation of the Friend Erythroleukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1985**, vol. 28, p. 1481–1485.
- <sup>25</sup> VOLLER, J., ZATLOUKAL, M., LENOBEL, R., DOLEŽAL, K., BÉREŠ, T., KRYŠTOF, V., SPÍCHAL, L., NIEMANN, P., DŽUBÁK, P., HAJDÚCH, M., STRNAD, M. Anticancer Activity of Natural Cytokinins: A Structure-activity Relationship Study. *Phytochemistry*. **2010**, vol. 71, p. 1350–1359.
- <sup>26</sup> KUCHARŤ, M., HOCEK, M., POHL, R., VOTRUBA, I., SHIH, I., MABERYB, E., MACKMAN, R. Synthesis, Cytostatic, and Antiviral Activity of Novel 6-[2-(Dialkylamino)ethyl]-, 6-(2-Alkoxyethyl)-, 6-[2-(Alkylsulfanyl)ethyl]-, and 6-[2-(Dialkylamino)vinyl]purine Nucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, vol. 16, p. 1400–1424.
- <sup>27</sup> NAUŠ, P., POHL, R., VOTRUBA, I., DŽUBÁK, P., HAJDÚCH, M., AMERAL, R., BIRKUŠ, G., WANG, T., RAY, A. S., MACKMAN, R., CIHLAR, T., HOCEK, M. 6-(Het)aryl-7-deazapurine Ribonucleosides as Novel Potent Cytostatic Agents. *J. Med. Chem.* **2010**, vol. 53, p. 460–470.
- <sup>28</sup> HUANG, H., LIU, H., CHEN, K., JIANG, H. Microwave-Assisted Rapid Synthesis of 2,6,9-Substituted Purines. *J. Comb. Chem.* **2007**, vol. 9, p. 197–199.
- <sup>29</sup> QU, G., XI, P., NIU, H., JIN, X., GUO, X., YANG, X., GUO, H. Microwave Promoted Palladium-catalyzed SuzukiMiyaura Cross-coupling Reactions of 6-Chloropurines with Sodium Tetraarylborate in Water. *Tetrahedron*. **2011**, vol. 67, p. 9099–9103.
- <sup>30</sup> KUCHARŤ, M., POHL, R., KLEPETÁŘOVÁ, B., HOCEK, M. Synthesis of Diverse 6-(1,2-Disubstituted ethyl)purine Bases and Nucleosides via 6-(Oxiran-2-yl)purines. *Tetrahedron*. **2008**, vol. 64, p. 10355–10364.
- <sup>31</sup> HOCKOVÁ, D., HOCEK, M., DVOŘÁKOVÁ, H., VOTRUBA, I. Synthesis and Cytostatic Activity of Nucleosides and Acyclic Nucleoside Analogues Derived from 6-(Trifluoromethyl)purines *Tetrahedron*. **1999**, vol. 55, p. 11109–11118.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
Bu	butyl
Bz	benzoyl
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	elementární analýza
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
Et	ethyl
EtOH	ethanol
GDP	guanosindifosfát
Glc	glukosa
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
IČ	infračervená spektroskopie
kvant.	kvantitativní
Me	methyl

---

MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	mikrovlnami asistovaná syntéza
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
Pd/C	palladium na uhlíku
Ph	fenyl
RNA	ribonukleová kyselina
RVO	rotační vakuová odparka
S <sub>N</sub>	nukleofilní substituce
S <sub>N</sub> Ar	nukleofilní aromatická substituce
TBAF	tertabutylamonium-flourid
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Tol	toluoyl
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
<i>t</i> <sub>i</sub>	teplota tání
UV	ultrafialový

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Strukturní vzorce základních monosacharidů. ....	12
<b>Obrázek 2:</b> Příklady dvou diastereomerů D-glukopyranosy (anomerní atom uhlíku je u každé sloučeniny označen hvězdičkou).....	12
<b>Obrázek 3:</b> Obecná struktura nukleosidů a nukleotidů.....	15
<b>Obrázek 4:</b> Přehled používaných chráněných derivátů monosacharidů.....	17
<b>Obrázek 5:</b> Základní ribosylované purinové nukleosidy. ....	23
<b>Obrázek 6:</b> Strukturní vzorec nebularinu.....	23
<b>Obrázek 7:</b> Cladribin.....	23
<b>Obrázek 8:</b> Strukturní vzorec základního sinefunginu.....	24
<b>Obrázek 9:</b> Crotonosid. ....	24
<b>Obrázek 10:</b> Puromycin. ....	24
<b>Obrázek 11:</b> Strukturní vzorec 2-amino-2-deoxyguanosin.....	25
<b>Obrázek 12:</b> Nukleocidin. ....	25
<b>Obrázek 13:</b> NBTI.....	25
<b>Obrázek 14:</b> 6-Sulfanylpurinribosid.....	26
<b>Obrázek 15:</b> Inosin. ....	26
<b>Obrázek 16:</b> Příklad glukosylovaných cytokininů. ....	27
<b>Obrázek 17:</b> ESI-MS spektra sloučeniny <b>4a</b> ; (a) +MS, (b) -MS.....	44
<b>Obrázek 18:</b> ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny <b>4b</b> . (a) +MS s detailem izotopického klastru protonovaného molekulového iontu; (b) -MS. ....	45
<b>Obrázek 19:</b> ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny <b>5</b> . (a) +MS; (b) detail izotopického klastru protonovaného molekulového iontu. ....	47
<b>Obrázek 20:</b> ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny <b>6</b> . ....	48

**SEZNAM TABULEK****Tabulka 1:** Reakční podmínky a výtěžky provedených glukosylací .....42**Tabulka 2:** Nukleofilní substituce vybranými primárními aminy .....43