

# Syntéza nových derivátů s pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovým skeletem

Bc. Vendula Tichavská

---

Diplomová práce  
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Vendula Tichavská

Osobní číslo: T16582

Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie potravin a bioaktivních látek

Forma studia: prezenční

Téma práce: Syntéza nových derivátů s pyrrolo[2,3-d]pyrimidinovým skeletem

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Zpracovat literární rešerši z oblasti možností syntézy sloučenin s pyrrolo[2,3-d]pyrimidinovým skeletem.
2. Stručně pojednat o významných biologicky aktivních derivátech pyrrolo[2,3-d]pyrimidinu.

### II. Praktická část

1. Provést sérii experimentů s cílem komparace konvenční a mikrovlnami asistované syntézy uvažovaných sloučenin.
2. Na základě získaných výsledků zvolit vhodnější metodu a připravit deriváty pyrrolo[2,3-d]pyrimidinu s doposud nepopsanou strukturou.
3. Provést úplnou strukturní charakterizaci všech připravených sloučenin.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SMITH, P. J., YUE, E. W. (ed.): *Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases as Anti-tumor Agents*. CRC Press Taylor & Francis Group, London 2007, 448 s. ISBN: 0-8493-3774-7.

[2] MANVAR, A., SHAH, A.: *Microwave-assisted chemistry of purines and xanthines. An overview*. *Tetrahedron*, 2013, 69, 8105-81274. ISSN: 0040-4020.

[3] SCHENONE, S. et al.: *Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as Kinase Inhibitors*. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24, 2059-2085. ISSN: 0929-8673.

[4] Dle doporučení vedoucího DP s využitím databází Chemical Abstracts a Scopus.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce:

**2. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



Ing. Michal Rouchal, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 16.5.2018

  
.....

---

<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). Odpirá-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

Sloučeniny obsahující pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinový skelet jsou stále více zkoumány, a to v souvislosti s jejich prokazatelnou biologickou aktivitou. Řada z nich vykazuje vysokou inhibiční aktivitu vůči různým typům proteinkináz, což by mohlo vést k vývoji nových léčiv proti různým nádorovým onemocněním (například akutní myeloidní leukémii, rakovině nosohltanu, tlustého střeva, prsu nebo mozku). Cílem předložené diplomové práce byla optimalizace metody přípravy derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu a to buď konvenční, nebo mikrovlnami asistovanou syntézou. Dalším cílem bylo připravit sérii 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů s dosud nepopsanou strukturou. Všechny připravené látky byly plně charakterizovány pomocí metod strukturní analýzy (GC-MS, ESI-MS, NMR a IR).

**Klíčová slova:** pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin, biologická aktivita, strukturní analýza, konvenční syntéza, mikrovlnami asistovaná syntéza

## ABSTRACT

Compounds bearing pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine ring are increasingly being investigated because of their demonstrable biological activity. Many of them exhibit a high inhibitory activity against number of proteinkinases, which could lead to the development of new drugs against various cancers such as acute myeloid leukemia, nasopharyngeal, colon, breast or brain cancer. The aim of this diploma thesis was to optimize the synthesis of pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives using both conventional and microwave-assisted synthesis. Furthermore, six new 4,7-disubstituted pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines was synthesized. All prepared compounds were fully characterized using spectral methods (e.g. GC-MS, ESI-MS, NMR or IR).

**Key words:** pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine, biological activity, structural analysis, conventional synthesis, microwave-assisted synthesis

## **Poděkování**

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

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Filipu Zatloukalovi za velké množství praktických rad při práci v laboratoři, Ing. Lence Trhlíkové za měření GC-MS spekter a elementární analýzy, doc. Robertu Víchovi za měření NMR spekter a za cenné rady během celého studia.

V neposlední řadě patří velké díky nejblíže rodině a příteli za podporu během celé doby studia.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1</b> <b>METODY SYNTÉZY PYRROLO[2,3-<i>D</i>]PYRIMIDINOVÝCH A PURINOVÝCH SLOUČENIN</b> .....	<b>11</b>
1.1    KONVENČNÍ SYNTÉZA .....	12
1.2    SYNTÉZA NA PEVNÉ FÁZI .....	15
1.3    MIKROVLNAMI ASISTOVANÁ SYNTÉZA .....	21
<b>2</b> <b>BIOLOGICKÁ AKTIVITA SLOUČENIN S PYRROLO[2,3-<i>D</i>] PYRIMIDINOVÝM SKELETEM</b> .....	<b>26</b>
<b>II</b> <b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
<b>3</b> <b>PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b> <b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
4.1    ALKYLACE 4-CHLOR-7 <i>H</i> -PYRROLO[2,3- <i>D</i> ]PYRIMIDINU .....	34
4.2    NUKLEOFILNÍ AROMATICKÁ SUBSTITUCE 4-CHLOR-7-ISOPROPYL-7 <i>H</i> - PYRROLO[2,3- <i>D</i> ]PYRIMIDINU .....	35
4.2.1    Konvenční syntézy .....	35
4.2.2    Mikrovlnami asistované syntézy .....	36
<b>5</b> <b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>41</b>
5.1    KOMENTÁŘ K DISKUZNÍ ČÁSTI DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	41
5.2    ALKYLACE 4-CHLOR-7 <i>H</i> -PYRROLO[2,3- <i>D</i> ]PYRIMIDINU .....	42
5.3    NUKLEOFILNÍ AROMATICKÁ SUBSTITUCE ATOMU CHLORU SLOUČENINY 2 .....	43
5.3.1    Konvenční syntéza za atmosférického tlaku .....	44
5.3.2    Konvenční syntéza za zvýšeného tlaku .....	46
5.3.3    Mikrovlnami asistovaná syntéza .....	48
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>59</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>61</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>65</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>67</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>69</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>70</b>



## ÚVOD

Purin a jeho bioisostery představují zajímavé skelety z pohledu medicínální chemie. Jedním z doposud nepříliš prozkoumaných bioisosterů je pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin, který se stal v posledních letech předmětem zájmu mnoha výzkumných skupin po celém světě, zejména pak těch orientujících svojí vědecko-výzkumnou činnost do oblasti syntézy nových sloučenin s možnou biologickou aktivitou. V literatuře je popsána řada derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu vykazujících inhibiční aktivitu vůči různým typům kináz, přičemž zavedením vhodných substituentů na pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinový kruh lze získat nové potenciální inhibitory těchto enzymů. Takové látky by mohly být v budoucnu v klinické praxi využívány zejména jako terapeutika proti nádorovým onemocněním.

V teoretické části této diplomové práce jsou nejprve popsány metody přípravy derivátů purinu. Jsou zde příklady syntéz derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu konvenčním způsobem, syntézou na pevné fázi a mikrovlnami asistovanou syntézou. Reakce jsou zaměřeny zejména na alkylaci, nukleofilní aromatickou substituci či Suzukiho coupling. Dále je věnována pozornost biologické aktivitě pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových derivátů. V obou kapitolách jsou řešeny nejnovější poznatky, které pak přispěly k určení směru experimentální práce.

V experimentální části jsou popsány jednotlivé postupy přípravy derivátů purinu, které byly v rámci této diplomové práce připraveny, včetně jejich strukturních charakteristik.

V diskuzní části, která svým uspořádáním kopíruje část experimentální, jsou výsledky získané v průběhu řešení této diplomové práce blíže komentovány.

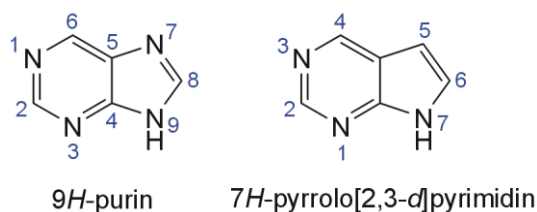
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 METODY SYNTÉZY PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDINOVÝCH A PURINOVÝCH SLOUČENIN

Tato kapitola bude popisovat postupy syntézy různých sloučenin s pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovým či purinovým skeletem pomocí konvenční syntézy, syntézy na pevné fázi a mikrovlnami asistované syntézy. Důvodem, proč bude pozornost věnována nejen látkám s pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovým skeletem, jejichž nové deriváty byly v rámci této diplomové práce syntetizovány, ale i derivátům purinovým je skutečnost, že portfolio doposud syntetizovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů není tak značné, jako je tomu v případě derivátů purinu a některé techniky nebyly pro přípravu této skupiny látek doposud použity, jak vyplývá z provedené literární rešerše.

Purinový skelet představuje kondenzovaný heterocyklický systém sestávající s pyrimidinového a imidazolového kruhu. V důsledku přítomnosti atomů dusíku na purinovém skeletu, které odčerpávají elektrony, jsou atomy uhlíku s nimi sousedící, tedy atomy uhlíku v polohách 2 a 6 pyrimidinového kruhu, a v menší míře i atom uhlíku v poloze 8 na imidazolové části purinového kruhu, elektronově deficitní. Purin neobsahuje žádná centra, která by reagovala s elektrofilními činidly, polohy 2 a 6 však podléhají nukleofilním aromatickým substitucím.<sup>1</sup>

Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidiny neboli 7-deazapuriny jsou dusíkaté heterocyklické sloučeniny patřící mezi bioisosterní deriváty purinu. Molekula 7-deazapurinu je složena z pyrimidinového a pyrrolového jádra a ve srovnání s purinem postrádá atom dusíku, který je na purinovém kruhu umístěn v poloze 7. Číslování atomů v molekule purinu a 7-deazapurinu dle Hantzsch-Widmanova systému je uvedeno na Obrázku 1.<sup>2</sup>



**Obrázek 1:** Struktura a číslování purinu a 7-deazapurinu.

Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidiny jsou třídou derivátů deazapurinu s mnoha potenciálními aplikacemi v chemii léčiv. Biologický význam purinových derivátů a potenciál jeho

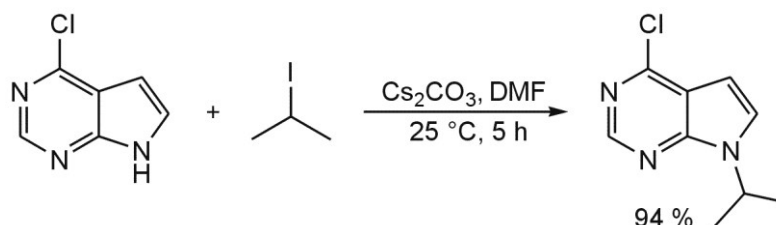
bioisosterů vede ke značnému zájmu o vývoj nových metod při syntéze derivátů těchto sloučenin s doposud nepopsanou strukturou.

## 1.1 Konvenční syntéza

Nejpoužívanější metoda syntézy analog purinu je konvenční, tedy klasická organická syntéza v roztoku. Nevýhodou tohoto typu syntézy je ve srovnání s mikrovlnami asistovanou syntézou delší reakční doba, která se pohybuje v řádech hodin. Na rozdíl od syntézy na pevné fázi lze touto metodou připravit větší množství požadovaného produktu.

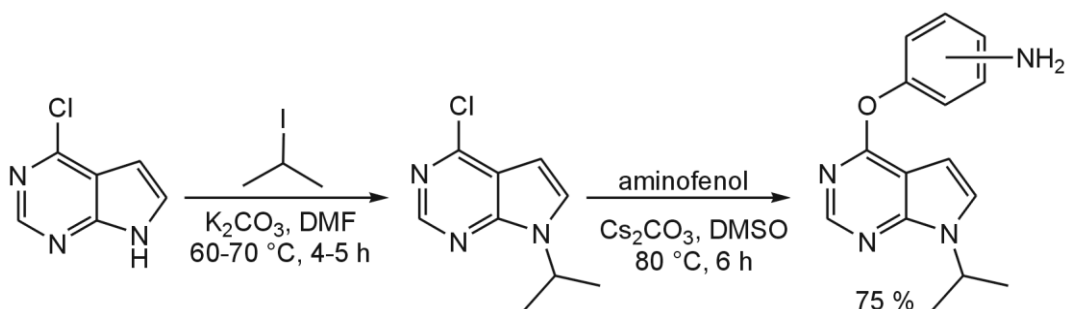
Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinový skelet je nejčastěji alkylován na atomu dusíku v poloze 7 a nejběžnější polohou pro nukleofilní aromatickou substituci je pak atomu uhlíku v poloze 4. Popsána je však řada sloučenin substituovaných na C2, C5 či C6.

Alkylaci atomu dusíku v poloze 7 komerčně dostupného 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu popisují ve své práci Arcari a kol., kteří zaváděli na tuto látku 2-jodpropan v přítomnosti Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jako báze, v prostředí DMF za laboratorní teploty.<sup>3</sup> Reakční doba činila 5 hodin a požadovaný produkt byl získán ve vysokém výtěžku 94 % (Obrázek 2).



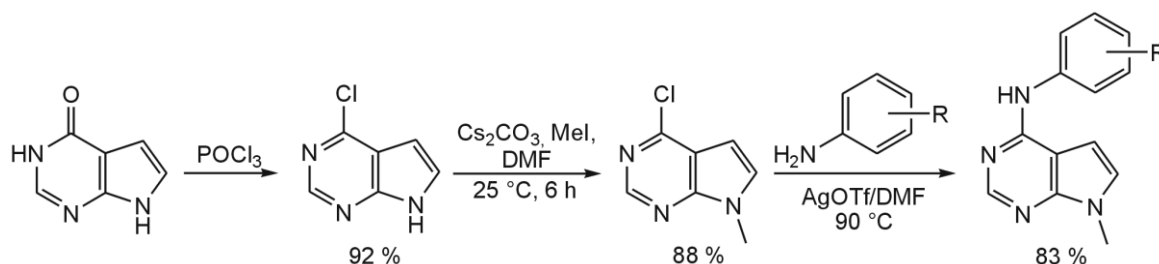
**Obrázek 2:** Příklad alkylace pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu.

Liu a kol. se ve své práci zabývali syntézou 6,9-disubstituovaných derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů.<sup>4</sup> Obecná použitá metoda je znázorněna na Obrázku 3. Výchozí látkou byl opět komerčně dostupný 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin. Prvním krokem dvoustupňové syntézy byla alkylace 2-jodpropanem za použití K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jako báze v prostředí DMF. Reakce probíhala při teplotě 60–70 °C po dobu 5 hodin. Výtěžek popsané alkylace bohužel autor neuvádí. Druhým krokem byla nukleofilní aromatická substituce atomu Cl za přítomnosti Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v DMSO při 80 °C po dobu 6 hodin. Finální produkt byl získán ve výtěžku 75 %.



**Obrázek 3:** Příklad alkylace a následné  $S_NAr$  derivátu pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu I.

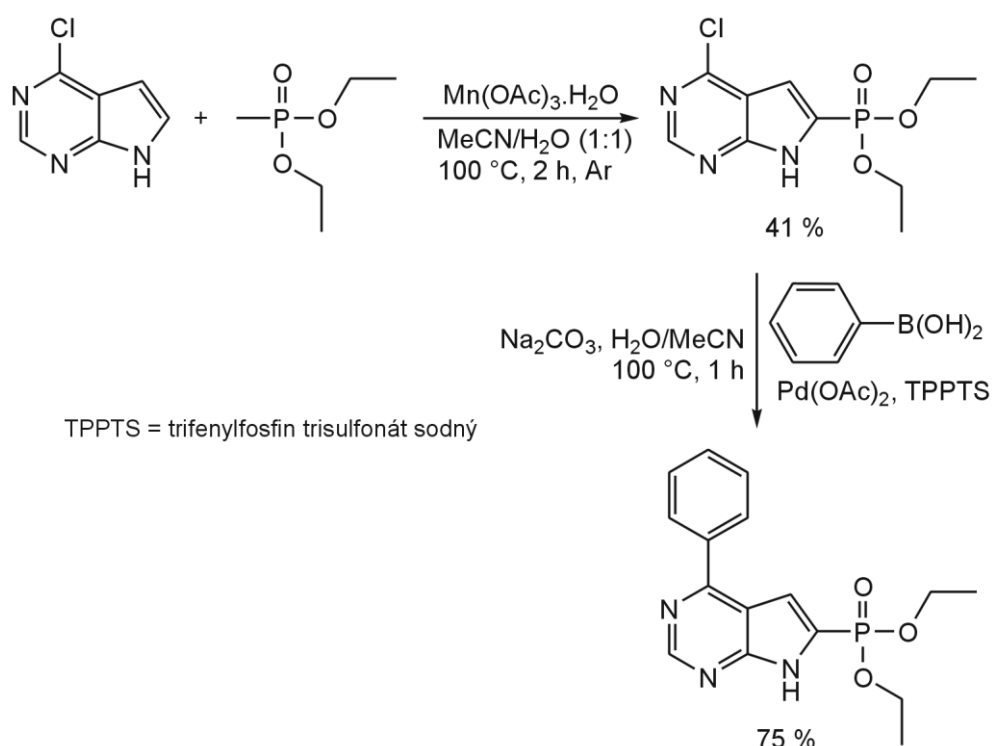
Li Sun a kol.<sup>5</sup> popisují syntézu nových 4,7-disubstituovaných derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu uvedenou na Obrázku 4. Pro přípravu uvažovaných sloučenin autoři nejprve provedli chloraci výchozího 3,7-dihydro-4*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-onu pomocí trichloridu fosforu. Následovala alkylace, kdy ponechali reagovat chlorderivát získaný v prvním kroku s jodmethanem v DMF za pokojové teploty. Jako báze byl použit  $Cs_2CO_3$  a reakce probíhala 6 hodin s výtěžkem 88 %. Následovala nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 4 anilinem katalyzovaná triflátem stříbrným při teplotě 90 °C. Výtěžek požadovaného produktu byl 83 %.



**Obrázek 4:** Příklad alkylace a následné  $S_NAr$  derivátu pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu II.

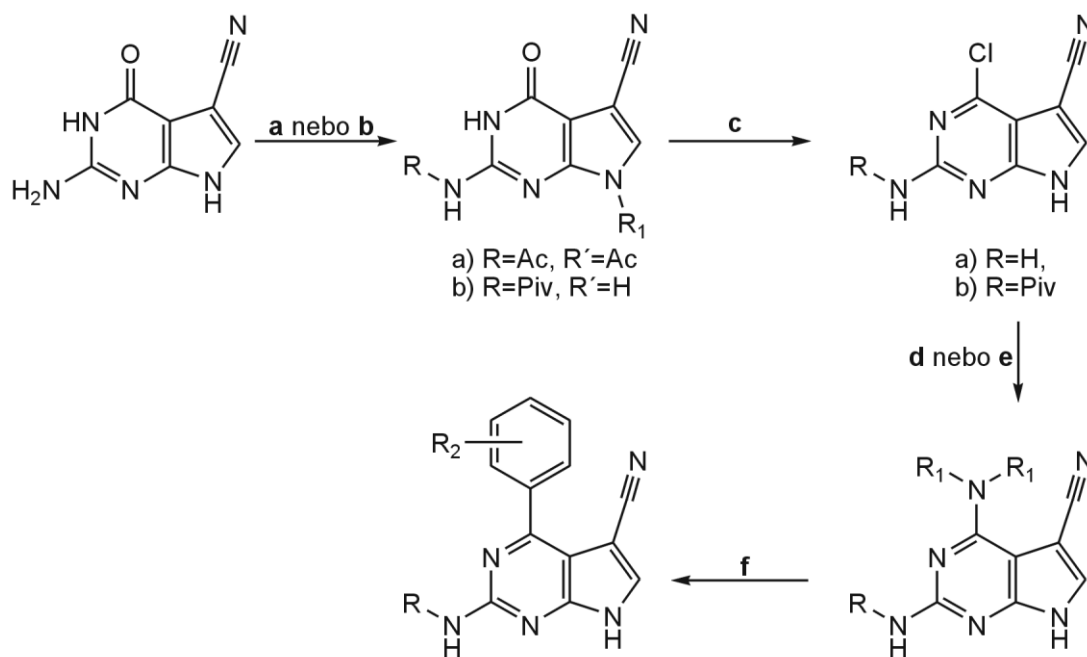
Substitucí atomu chloru v poloze 4 fosfonátovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů se zabývali Sabat a kol.<sup>6</sup> Fosfonátované deazapuriny vykazují široké spektrum biologických účinků, například fosfonátové analogy nukleotidů jsou důležitými antivirotyky a nukleotidové analogy nesoucí fosfonátovou skupinu inhibují fosforibosyltransferázy. Prvním reakčním krokem byla „manganem“ iniciovaná C–H fosfonace 4-chlorpyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu, který byl substituován na příslušnou fosfonovou skupinu při teplotě 100 °C po dobu 2 hodin. Reakce probíhala regioselektivně, a sice do polohy 6. Druhý reakční krok představovala Suzukiho-Miyaurova reakce, která je založena na reakci boronové kyseliny s organohalogenem katalyzovanou komplexem palladia, jejímž typickým rysem je tvorba vazby C–C. Reakční mechanismus Suzukiho couplingu je nejlépe popsán z pohledu Pd

katalyzátoru. Prvním krokem je oxidativní adice Pd na alkyl halogeny, při kterém dochází k formování organopalladnatých sloučenin. Následné přidání báze umožňuje vznik meziproduktů, které přes transmetalaci s boronátovými komplexy tvoří další organopalladnaté sloučeniny. Požadovaný produkt je poté získán reaktivní eliminací a Pd katalyzátor je obnoven, čímž je dokončen katalytický cyklus.<sup>7</sup> Autoři ve své práci použili fenyl-boronovou kyselinu a jako katalyzátor octan palladnatý ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ) (Obrázek 5).



**Obrázek 5:** Příklad  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  atomu Cl derivátu pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu I.

Přípravou N4-substituovaných 2-amino-5-kyanopyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů se zabývali také Anthony a kol.<sup>8</sup> U výchozího 2-amino-5-kyanopyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu, který byl syntetizován dle dříve publikovaného postupu,<sup>9</sup> byla ochráněna primární aminová skupina v poloze 2, kdy byl získán odpovídající diacetylový nebo pivaloylový (piv) derivát, který byl následně převeden na arylchlorid a použit pro přípravu série sloučenin nukleofilní aromatickou substitucí s řadou primárních a sekundárních aminů (Obrázek 6). Dalším krokem pro získání finálního produktu byla reakce s kyselinou boronovou a ethyl-acetátem za podmínek Suzukiho-Miyaurových reakcí.



Podmínky:

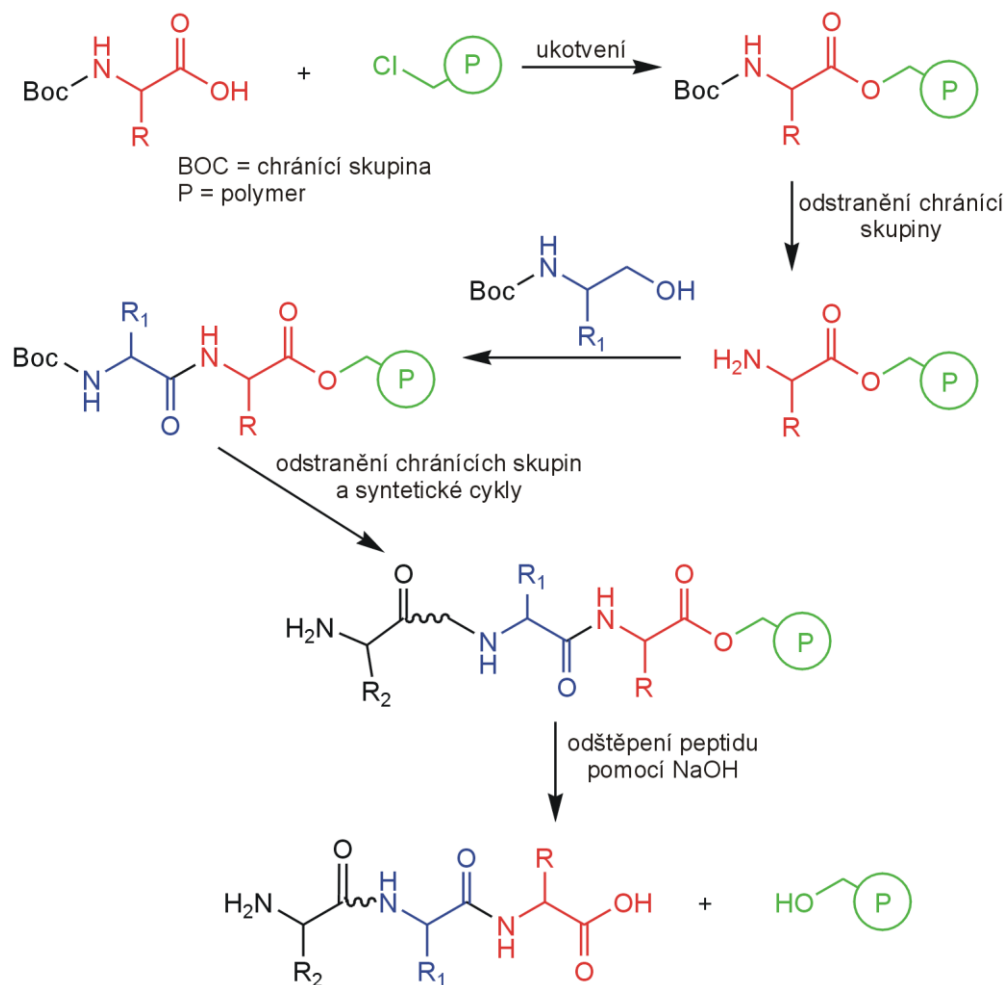
**a)** Ac<sub>2</sub>O, DMF, 150 °C, 4 h; **b)** PivCl, pyridin, 85 °C; **c)** POCl<sub>3</sub>, DMA; **d)** amin, Et<sub>3</sub>N, 1,4-dioxan 200 °C (MW), 20 min; **e)** amin, Et<sub>3</sub>N, *n*-BuOH, reflux, 16 h nebo KOH, EtOH, 80 °C, 20 h; **f)** kyselina boronová/ester, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, AcOK, H<sub>2</sub>O/dioxan, 110 °C, 16 h

**Obrázek 6:** Příklad S<sub>N</sub>Ar atomu Cl derivátu pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu II.

## 1.2 Syntéza na pevné fázi

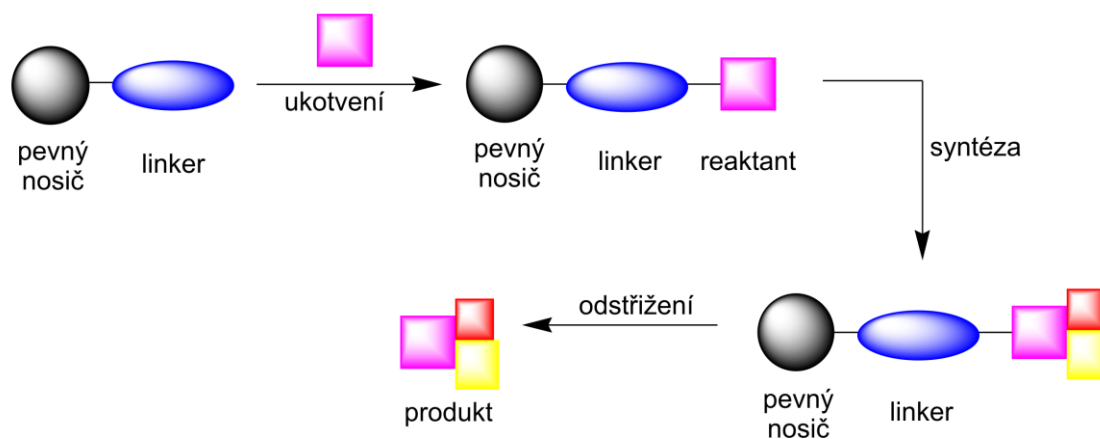
Ve srovnání s konvenční a mikrovlnami asistovanou syntézou má příprava sloučenin na pevné fázi tu výhodu, že umožňuje velice rychlou izolaci syntetizovaných látek, relativně jednoduchou přípravu požadovaných produktů a nejsou kladeny přílišné požadavky na časovou náročnost (jako je tomu zejména při použití konvenčních metod). Nevýhodou syntézy na pevné fázi je, že umožňuje připravit relativně malé množství finálního produktu, představuje velké omezení z hlediska vhodného typu nosiče a linkeru a také je náročná optimalizace reakčních podmínek.<sup>10</sup>

Za zakladatele organické syntézy na pevné fázi je považován Robert B. Merrifield, který byl za svůj objev oceněn v roce 1984 Nobelovou cenou. Již v roce 1963 popsal syntézu peptidů, přičemž jako pevnou fázi použil chlormethylovanou polystyrenovou pryskyřici. Substitucí chlormetylenových funkčních skupin připravil tetrapeptidový řetězec (Obrázek 7).<sup>11</sup>



**Obrázek 7:** Základní postup syntézy peptidů podle Merrifielda.

Principem této metody je tedy navázání sloučeniny na pevném nosiči pomocí linkeru. Takto zakotvená sloučenina je podrobena reakci, po jejímž ukončení jsou jednotlivé reaktanty vymyty spolu s rozpouštědlem. Promytím pevné fáze je získán konečný produkt (Obrázek 8).<sup>12</sup>



**Obrázek 8:** Princip syntézy na pevné fázi.



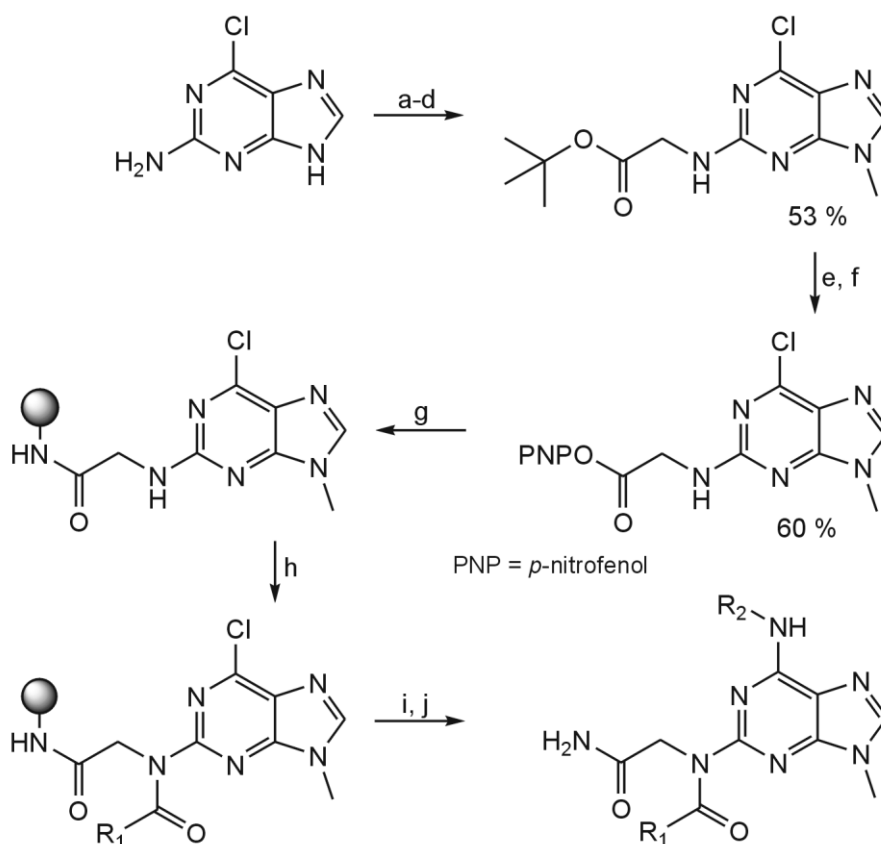
Pevný nosič by měl splňovat obecné požadavky, jako jsou mechanická stabilita, stabilita a inertnost při podmínkách použitých během syntézy, kompatibilita s polárními či nepolárními rozpouštědly a měl by poskytovat vhodnou skupinu pro spojení s linkerem. Nejčastěji používaný polymer jako pevný nosič je polystyren zesíťovaný 1% nebo 2% vinylbenzenem, který je vhodný zejména pro reakce při vyšších teplotách nebo pro reakce s organokovovými činidly.<sup>13</sup>

Linkery mají za úkol připojit cílovou sloučeninu k pevnému nosiči. Musí být za všech podmínek, použitých během syntézy, chemicky inertní a také musí být z nosiče jednoduše odštěpena cílová sloučenina.<sup>14</sup> Připojení cílové skupiny na linker může být provedeno dvěma způsoby. Obvykle je substrát připojen k předem vytvořenému linkeru na pevném nosiči, avšak v některých případech je výhodné připevnit substrát k linkeru již ve fázi roztoku a připojit ho k nosiči.<sup>15</sup> Tato druhá metoda může být použita například tehdy, je-li předem vytvořený spojovací článek nestabilní při skladování, zatěžovací reakce je z důvodu sterických nebo elektronových důvodů znevýhodněna nebo reakce vede k nežádoucím vedlejším produktům, které by kontaminovaly konečné produkty.<sup>16</sup>

Metody syntéz purinových derivátů je dnes celá řada. K dispozici jsou různé strategie pro připojení purinového skeletu k pevné fázi v různých polohách. Stejně tak jsou tyto postupy aplikovatelné na purinové biosotery, jako jsou 1/3-deazapuriny, 7-deazapuriny, 9-deazapuriny, nebo thiazolopyrimidiny.<sup>17</sup>

První syntéza derivátu purinu na pevné fázi byla popsána již v roce 1996.<sup>18</sup> Byla provedena na pryžové pryskyřici s použitím 2-amino-6-chlorpurinu. Purinový skelet byl připojen k pryskyřici glycinamidem umístěným na C2 (Obrázek 9). V prvním kroku syntézy byla provedena methylace 2-amino-6-chlorpurinu, která poskytovala směs N7- a N9-methylovaných isomerů. Exocyklický amin byl trifluoracetylován, alkylován *tert*-butyl  $\alpha$ -jodacetátem a vzniklý trifluoracetamid byl zmýdelněn. Poté následovalo acidem katalyzované štěpení C2, N9 substituovaného 6-chlorpurinu následované aktivací volné kyseliny *p*-nitrofenolem pomocí PyBroP, čímž vznikl aktivní ester. Spojení esteru s volným aminem navázaným na pevném nosiči bylo dokončeno za 12 hodin. Dalším reakčním krokem byla acylace exocyklického dusíku. Reakce purinu s dichlormethanovým roztokem chloridu kyseliny v přítomnosti 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridinu vedla k úplné kopulaci po 12 hodinách, poskytující terciární amid. Následně byla provedena nukleofilní aromatická substituce chlorpurinu primárními a sekundárními aminy. Po odštěpení z nosiče

za použití směsi dichlormethan/trifluoroctová kyselina/dimethylsulfid byly izolovány konečné deriváty purinů.



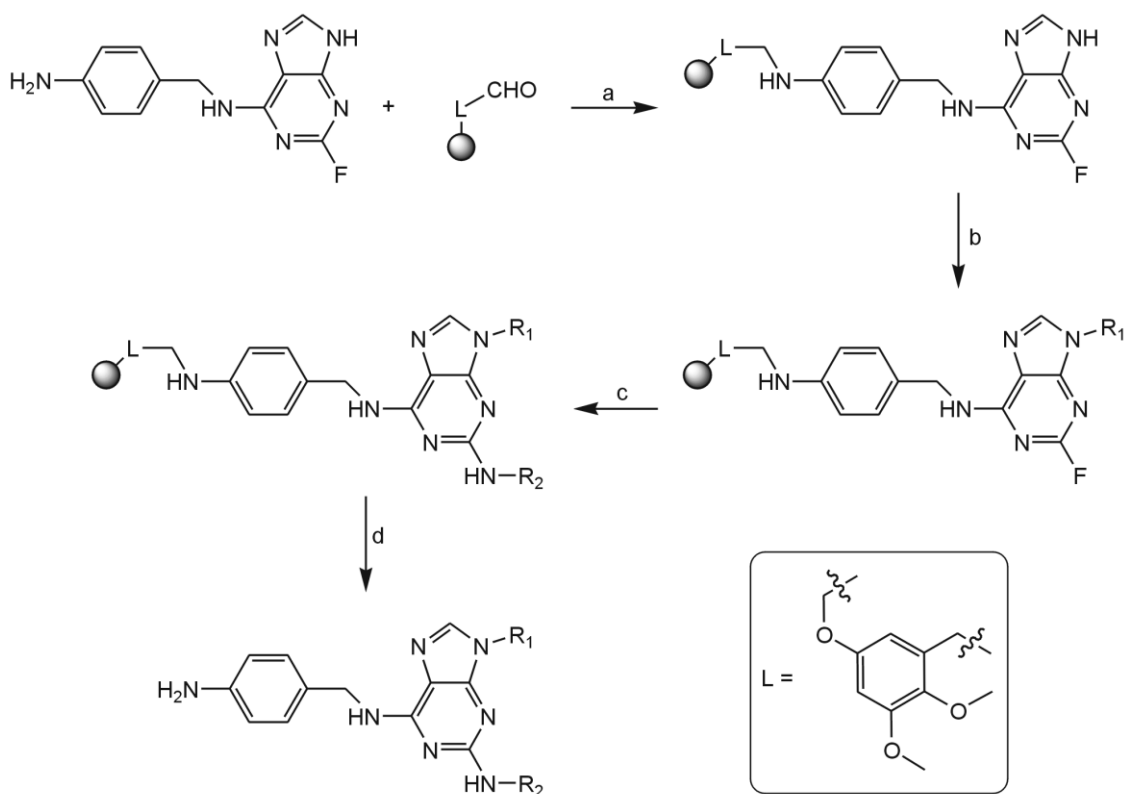
Podmínky:

a) NaH (1,1 ekv.), MeI (1 ekv.), DMF; b) anhydrid kyseliny trifluoroctové (3 ekv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) NaH (1,1 ekv.), *tert*-butylodacetát (2 ekv.), DMF; d) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH; e) TFA, 1,4-dimethoxybenzen; f) PyBroP (1 ekv.), *p*-nitrofenol (1 ekv.), DIEA (3 ekv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; g) 0,05 M produktu, pevná fáze, 0,06 M DIEA, DMF, 37 °C, 12 h; h) 0,2 M R<sub>1</sub>COCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,25 M 4-methyl-2,6-di-*tert*-butylpyridin, 37 °C, 12 h; i) R<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, DMF/DMSO, 1/1 (v/v), 4 °C, 16 h; j) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/Me<sub>2</sub>S, X/Y/Z (v/v/v), 25 °C, 2 h

**Obrázek 9:** První syntéza derivátu purinu na pevné fázi.

Schulz<sup>19</sup> ve své práci poprvé na purinu imobilizoval polohu C6. Tento výzkum byl zaměřen na přípravu 2,9-disubstituovaných purinů jako potenciálních CDK inhibitorů. Klíčovým stavebním blokem byl *N*-(4-aminobenzyl)-2-fluor-9*H*-purin-6-amin, který byl alkylován PAL pryskyřicí (Obrázek 10). Vznikající meziproduct byl následně úspěšně alkylován v poloze N9, a to jak primárními, tak sekundárními alkoholy. Poté byla provedena nukleofilní aromatická substituce atomu fluoru v poloze C2 různými primárními aminy. Vzhledem k přítomnosti atomu fluoru vyžadovala reakce relativně mírné reakční

podmínky ve srovnání s analogy chloru. Následující štěpení pomocí TFA poskytlo konečný purinový derivát.

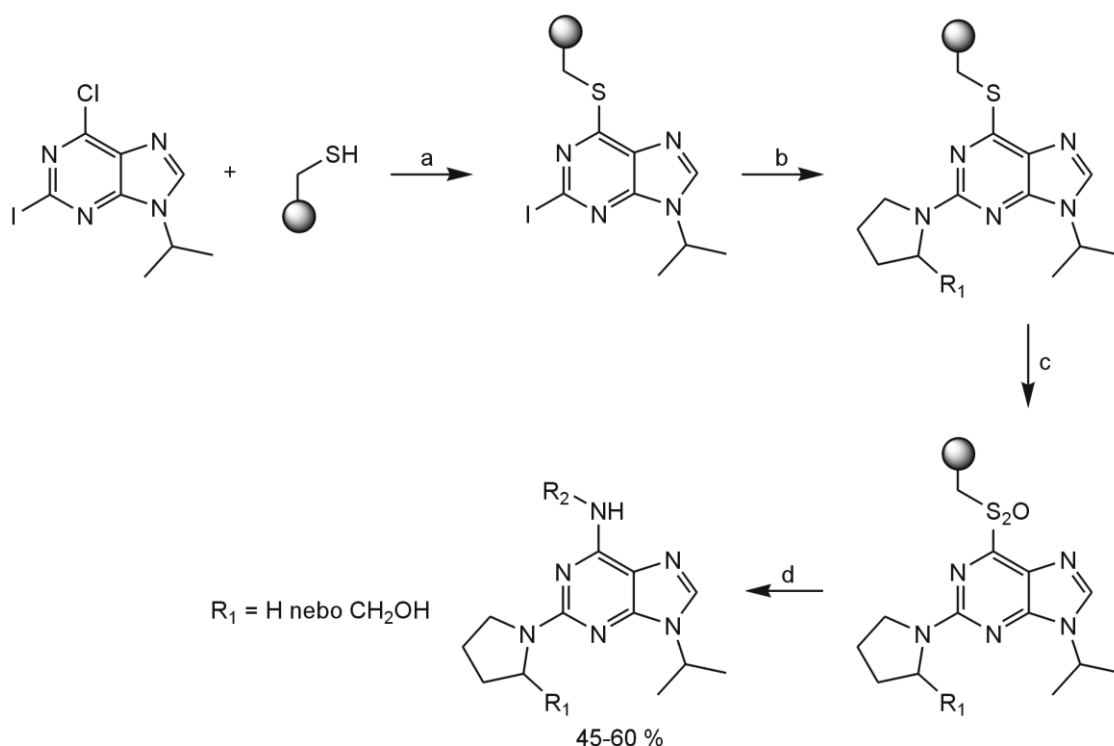


Podmínky:

a)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , DMF, 25 °C, 12 h; b)  $\text{R}_1\text{OH}$ , DEAD,  $\text{PPh}_3$ , DCM/THF, 25 °C, 48 h; c)  $\text{R}_2\text{NH}_2$ , *n*-BuOH, DMSO, 100 °C, 48 h; d) TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{Me}_2\text{S}$  (95/5/5, v/v/v), 25 °C, 1 h

**Obrázek 10:** Příklad syntézy 2,6,9-trisubstituovaných purinů na pevné fázi.

Substituci purinového derivátu na C6 na pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu pomocí pevné fáze popisuje také Legraverend.<sup>20,21</sup> Výchozí látka, 6-chlor-2-jod-9-isopropyl-9*H*-purin, byla ponechána reagovat s SH-pryskyřicí popsanou Merrifieldem,<sup>11</sup> čímž byla získána sloučenina navázaná na pryskyřici a došlo k imobilizaci 6-sulfanyl-2-jod-9-isopropyl-9*H*-purinu. Jod v poloze C2 byl následně substituován pyrrolidinem nebo pyrrolidin-2-methanolem. V dalším kroku byl sulfid oxidován na odpovídající sulfonyl, který se nechal reagovat s primárními aminy v THF při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin (Obrázek 11). 2,6,9-Trisubstituované purinové deriváty byly získány ve výtěžku 45–60 %.

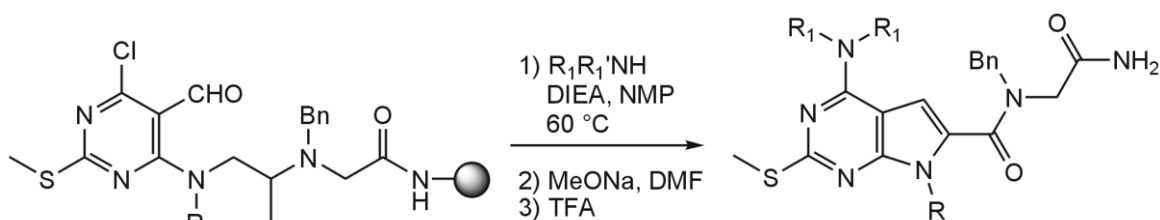


Podmínky:

a) DMF, *t*BuOK, 70 °C; b) pyrrolidin nebo pyrrolidin-2-methanol, TPA, DMA, 80 °C; c) mCIPBA, DCM, 25 °C, 24 h; d)  $R_2\text{NH}_2$ , THF, 60 °C, 24 h

**Obrázek 11:** Příklad syntézy 2,6,9-trisubstituovaných purinů na pevné fázi.

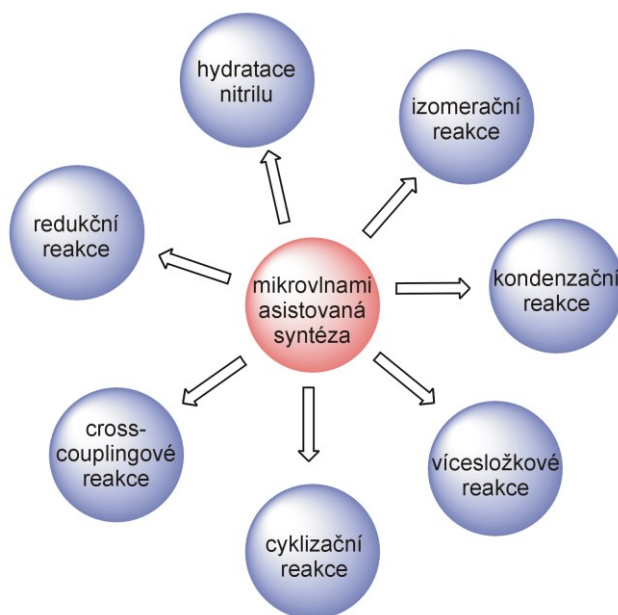
Syntézou 2,4,6,7-tetrasubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů na pevné fázi se ve své práci zabývali Ji-Hoon a kol.<sup>22</sup> V jednom reakčním kroku docházelo souběžně k aminaci sekundárními aminy na C4 pomocí DIEA a NMP při 60 °C a cyklizaci, která probíhala v přítomnosti methoxidu sodného (MeONa) a DMF, díky kterému nejdříve dochází k vymývání chloridu *N,N*-dimethylaminem a výsledná *N,N*-dimethylaminoskupina na heterocyklu pak cyklizaci usnadňuje (Obrázek 12). Následující štěpení pomocí TFA poskytlo konečný pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinový derivát.



**Obrázek 12:** Příklad syntézy 2,4,6,7-tetrasubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů na pevné fázi.

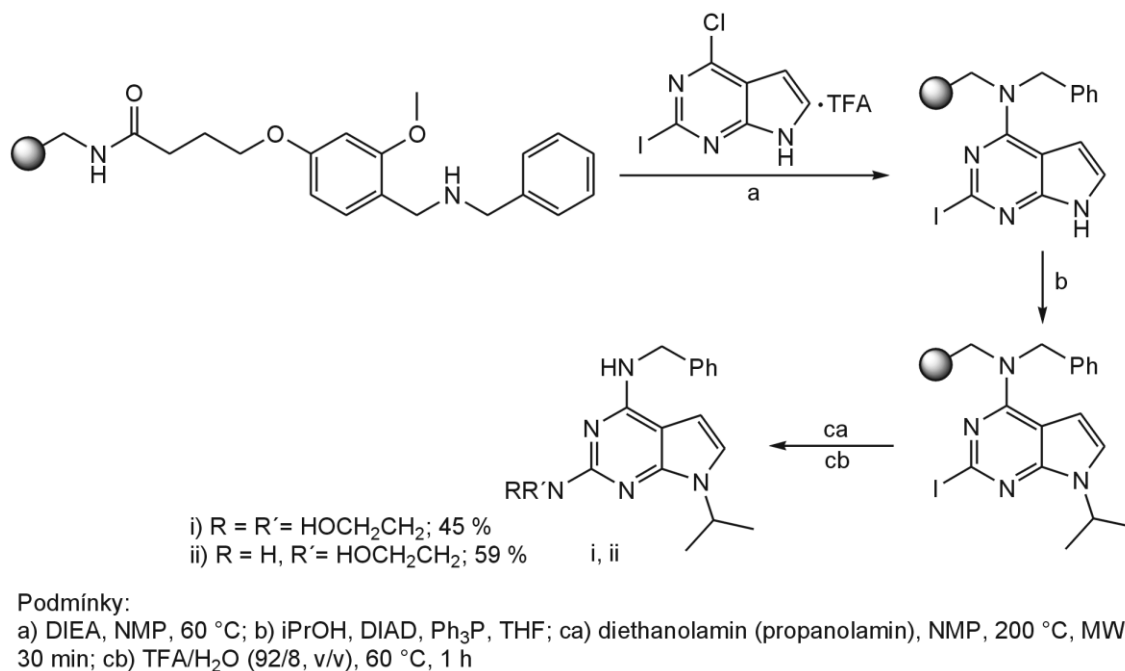
### 1.3 Mikrovlnami asistovaná syntéza

Syntéza pomocí mikrovlnného ohřevu představuje široce využívanou metodu napříč jednotlivými oblastmi organické chemie (Obrázek 13). Tato metoda disponuje oproti ostatním typům syntéz hned několika výhodami. Jednou z nich je rapidní snížení reakční doby z několika jednotek až desítek hodin na minuty. Díky tomu získala tato metoda obrovskou popularitu v organické syntéze. Se zkrácenou dobou reakce souvisí i spotřeba energie, která je ve srovnání s konvenční metodou nižší, a proto je mikrovlnami asistovaná syntéza efektivnější. Aplikace mikrovlnami asistované syntézy vede ve většině známých případů také k získání požadovaných sloučenin ve vyšších výtěžcích a čistotě (ve srovnání s konvenční syntézou).<sup>23</sup> Nevýhodou této metody je ekonomická náročnost plynoucí z relativně vysokých nákladů na pořízení a následné údržby přístroje.



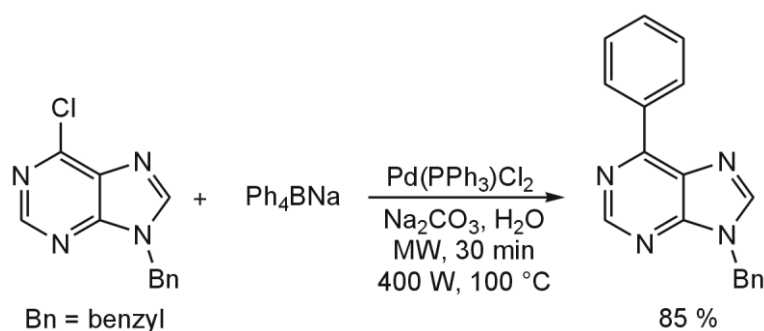
**Obrázek 13:** Využití mikrovlnami asistované syntézy v oblasti organické chemie.

Syntézu mikrovlnným ohřevem lze provádět na principu pevné fáze nebo klasicky v roztoku. Mikrovlnou syntézu na pevné fázi popisuje dřívější studie,<sup>24</sup> kde byl jako polymer použit polystyren spojený s „AMEBou“ (z anglického Acid sensitive MEthoxy BenzAldehyde), který byl podroben reduktivní aminaci. Rozdíl oproti klasické syntéze na pevné fázi je v posledním kroku syntézy, kde dochází ke klíčovému vytlačení jódu z C2 pomocí mikrovlnného ozařování po dobu 30 minut při teplotě 200 °C (Obrázek 14). Takový čas syntézy je ve srovnání s konvenční technikou ohřevu (olejová lázeň), která trvá až 48 hodin, velice krátký.



**Obrázek 14:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu na pevné fázi.

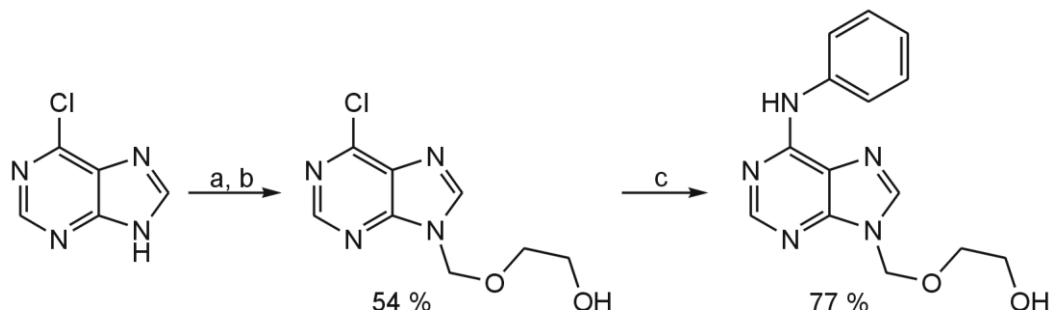
Příkladem syntézy derivátu purinu v roztoku pomocí mikrovln je metoda pro syntézu 6-arylpurinů založená na bázi Suzukiho-Miyaurovy reakce (princip popsán na str. 14). Východí látka, 9-benzyl-6-chlor-9H-purin, reaguje s arylačním činidlem tetrafenylboritanem sodným v destilované vodě za použití palladiového katalyzátoru.<sup>25</sup> Požadovaný produkt byl získán ve výtěžku 85 % a uspokojivé čistotě (Obrázek 15).



**Obrázek 15:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku I.

Jako další příklad aplikace mikrovlnami asistované syntézy může sloužit příprava nové série acyklických nukleosidových analogů na bázi 6,9-disubstituovaných purinů (Obrázek 16).<sup>26</sup> Nejprve reagoval 1,3-dioxolan s jodtrimethylsilanem v suchém cyklohexanu při -78 °C, čímž byl získán jodmethyltrimethylsilyloxyethylether jako meziprodukt. Ten byl přidán ke směsi 6-chlorpurinu v DMF při -50 °C a vznikl alkylovaný 6-chlorpurin v poloze 9. Vzniklý produkt byl následně podroben mikrovlnami asistované

nukleofilní aromatické substituci atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu, a to anilinem za přítomnosti diisopropylethylaminu (DIPEA) jako báze, po dobu 10 minut, při teplotě 120 °C. Požadovaný produkt byl získán v uspokojivém výtěžku 77 %.

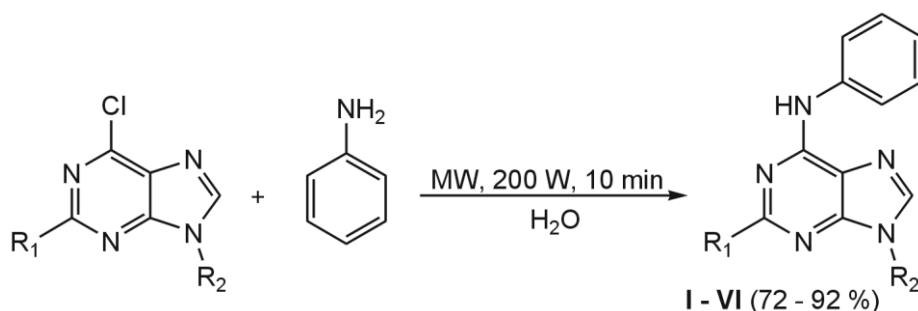


Podmínky:

a) 1,3-dioxolan, TMSI, cyklohexan, -78 °C, 30 min; b) NaH, DMF, -50 °C až 25 °C, 2 h, KF (aq); c) anilin, DIPEA (1,1 ekv.), MW, 120 °C, 150 W, 10 min, EtOH

**Obrázek 16:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku II.

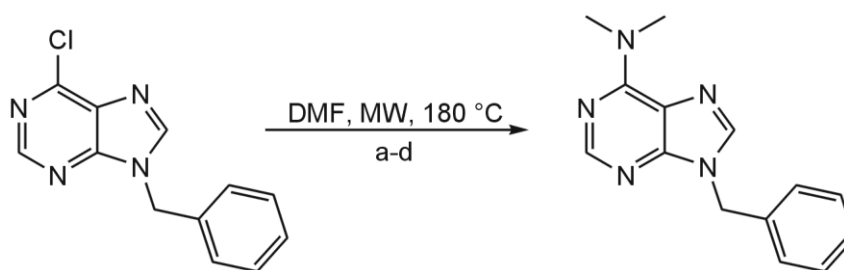
Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru asistovaná mikrovlnami je popsána také v publikaci,<sup>27</sup> v níž byla provedena série experimentů vedoucí ke vzniku 6-substituovaných aminopurinových derivátů, které v moderní antivirotické a protinádorové léčbě hrají důležitou roli. Všechny reakce byly provedeny za stejného výkonu (200 W) a reakčního času (10 minut). Popsáno je pouze reakční schéma vybraných C2 a N9 substituovaných purinů s anilinem (Obrázek 17). Výtěžky reakcí se pohybovaly od 72 do 92 %.



Sloučenina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Výtěžek (%)
I	H	H	87
II	Cl	H	87
III	NH <sub>2</sub>	H	72
IV	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	92
V	Cl	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	89
VI	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	80

**Obrázek 17:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku III.

Také Čechová L. a kol.<sup>28</sup> provedli optimalizaci substituce atomu chlóru v poloze 6 purinového skeletu za použití mikrovlnné syntézy. Byla provedena série experimentů s výchozími C2 a N9 různě substituovanými puriny. Popsáno je pouze reakční schéma, kde jako výchozí látka vystupuje 9-benzyl-6-chlorpurin v DMF. Reakce byla provedena buď bez báze anebo s přidavkem různých bází. Jako nejlepší se s výtěžkem 96 % ukázala reakce 9-benzyl-6-chlorpurinu ve směsi s DMF a s přidavkem bezvodého chlorovodíku, přičemž reaguje dimethylamin vzniklý při rozkladu DMF ihned s chlorovým derivátem (Obrázek 18). V průběhu nukleofilní aromatické substituce se vytváří HCl, který následně katalyzuje další rozklad DMF. Při použití kyseliny chlorovodíkové není umožněn rozklad DMF, proto byl převeden na bezvodý HCl v DMF.



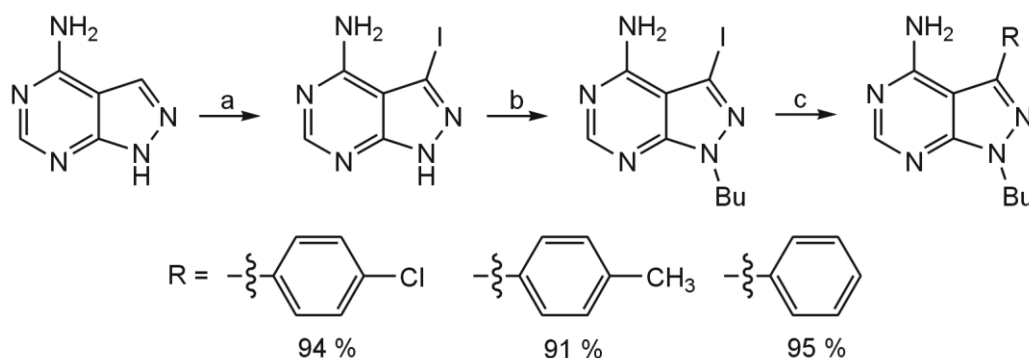
a) 1 min, 92 %; b) 25 min, *t*BuOK, 50 %; c) 7 min, DMPA, 62 %; d) 2 min, HCl, 96 %

**Obrázek 18:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku IV.

Syntézou purinového analogu N1 a C3 substituovaného pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinu se ve své publikaci zabývali Todorovic a kol.<sup>29</sup> Výchozí látkou pro zavedení aromatických substituentů do polohy 5 pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinového skeletu byl komerčně dostupný 4-aminopyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin, který v prvním kroku reagoval s *N*-jodsukcinimidem při 90 °C po dobu 10 minut. Vzniklá sloučenina byla následně podrobena alkylaci na N7 s cílem navázat do této polohy stericky neobjemný nepolární alifatický substituent, a sice butan-1-yl. Toho bylo dosaženo za podmínek Mitsunobova couplingu, tedy reakcí s butan-1-olem v přítomnosti diisopropylazodikarboxylátu a trifenylofosfinu. Výtěžky reakce se pohybovaly od středních po vynikající (37–80 %) avšak potřeba opakované chromatografie k odstranění současně vznikajícího trifenylofosfinoxidu vedla k vývoji alternativní metody alkylace, a to reakcí s 1-brombutanem za přítomnosti uhličitanu draselného. V posledním reakčním kroku byla provedena mikrovlnami asistovaná substituce atomu jodu na C5, a to reakcí s různými aromatickými deriváty kyseliny boronové za přítomnosti palladiového katalyzátoru obsahujícího 1,3,5,7-



tetramethyl-2,4,8-trioxo-6-fenyl-6-fosfaadamantan (PA-Ph), přičemž požadované sloučeniny byly získány ve výborných výtěžcích v rozmezí 91–95% (Obrázek 19).



Podmínky:

a) *N*-jodsukcinimid, MW, 90 °C, 10 min; b) butan-1-ol, DIEA, PPh<sub>3</sub> nebo 1-brombutan, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; c) R<sub>2</sub>-B(OH)<sub>2</sub>, Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>/PA-Ph, MW, 70 °C, 30 min

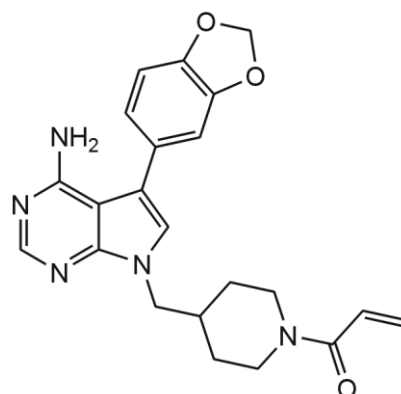
**Obrázek 19:** Příklad mikrovlnami asistované syntézy pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinu v roztoku.

## 2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA SLOUČENIN S PYRROLO[2,3- D]PYRIMIDINOVÝM SKELETEM

Purinové deriváty, stejně jako purinové bioisostery, mají velký význam v medicíně. Ve velké míře jsou součástí přirozeně se vyskytujících sloučenin a také v klinicky významných molekulách vykazujících různé biologické účinky. V následující kapitole budou shrnuty pouze nejnovější poznatky v oblasti výzkumu biologické aktivity pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových derivátů.

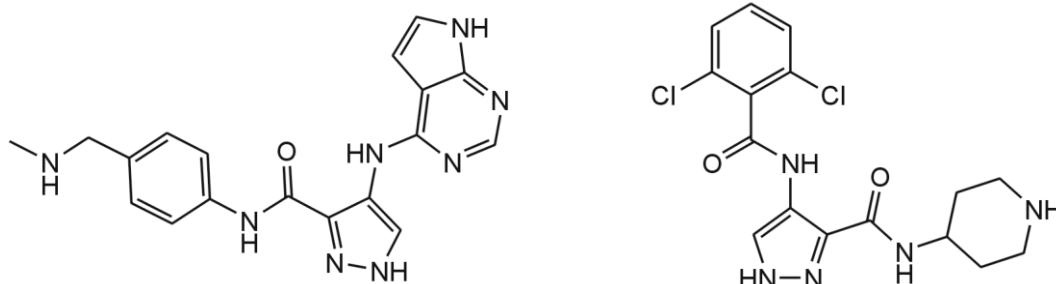
Jedna z nejnovějších studií biologické aktivity sloučenin nesoucích pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinové jádro se zabývá identifikací ireverzibilních inhibitorů Brutonovy tyrosinkinázy (Btk).<sup>30</sup> Brutonova tyrosinkináza je kináza z rodiny Tec. Tec kinázy představují druhou největší rodinu nереceptorových tyrosinkináz a aktivují se jako odpověď na buněčnou stimulaci antigenními receptory, integriny, růstovými faktory, cytokiny a receptory spojenými s G proteinem. Rodina Tec Mammalian se skládá z pěti členů: Tec, Btk, Itk / Emt / Tsk, Rlk / Txk a Bmx / Etk. Btk inhibitory mají definovanou úlohu v signálních cestách receptoru B buněk (BCR) a Fcγ receptoru (FcR), což z ní činí jedinečný cíl pro léčbu autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida. Byla syntetizována série 4,5,7-trisubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů a zkoumána jejich inhibiční aktivita vůči zmiňované Btk. Většina z připravených sloučenin vykazovala výbornou inaktivaci Btk, avšak většina z nich také inhibovala lidské embryonální ledvinové buňky HEK293, což by mohlo vést k závažnému poškození ledvin. Ze série připravených sloučenin byla vybrána látka, jejíž strukturní vzorec je, spolu s inhibičními koncentracemi, uveden na Obrázku 20. Tato sloučenina prokázala nejen aktivitu vůči Btk přes blízké příbuzné kinázy *in vitro*, ale zároveň také nízkou cytotoxicitu vůči buňkám HEK293, stejně jako vůči buňkám LO2 (lidské jaterní buňky) a THP-1 (lidská monocytická buněčná linie). Díky kombinaci příznivých fyzikálně-chemických vlastností, kinázové selektivity, farmakokinetického profilu a nízké toxicity představuje tato sloučenina účinný, selektivní a méně toxický inhibitor Btk a má potenciál účinně léčit artritidu.

buněčná linie	HEK293	LO2	THP-1
IC <sub>50</sub> /μM	34,2 ± 1,9	31,3 ± 2,1	38,9 ± 1,5



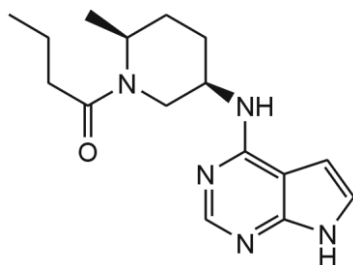
**Obrázek 20:** Struktura nového Btk inhibitoru spolu s inhibičními koncentracemi.

Předmětem studií zabývajících se syntézou nových biologicky aktivních látek jsou zejména ty se schopností účinně inhibovat aktivitu tyrosin kináz (TK) a cyklin-dependentních kináz (CDK). V nedávné době byla provedena studie inhibiční aktivity řady sloučenin se zaměřením se právě na TK a CDK.<sup>31</sup> S výborným potenciálem pro další vývoj léčiv v terapii akutní myeloidní leukémie (AML) byla zvolena sloučenina s pyrazolo[2,3-*d*]pyrimidinovým jádrem (Obrázek 21). Tato sloučenina inhibující FLT3, CDK2, CDK4 a CDK6 s hodnotami IC<sub>50</sub> (inhibiční koncentrace způsobující úhyn 50 % buněk) v nanomolární koncentraci, vykazuje rovněž antiproliferační aktivitu proti buňkám MV4-11 (IC<sub>50</sub> = 0,008 μM), což koreluje s potlačením fosforylace retinoblastomu, FLT3, ERK, AKT a STAT5 a nástupem apoptózy. Studie akutní toxicity u myši ukázaly, že tato sloučenina (LD<sub>50</sub> = 186 mg·kg<sup>-1</sup>) je méně toxická, než v této studii použitý modelový inhibitor s pyrazolovým skeletem označovaný jako AT7519 (32 mg·kg<sup>-1</sup>). V současné době je látka FN-1501 ve fázi I klinických studií ve Spojených státech amerických a v Číně pro léčbu akutní myeloidní leukémie.<sup>32</sup>



**Obrázek 21:** Struktura nového FLT3 a CDK inhibitoru FN-1501 (vlevo) a struktura AT7519 (vpravo).

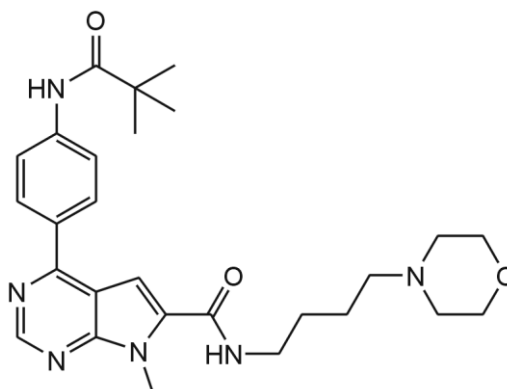
Syntézou nových látek schopných účinně inhibovat aktivitu tyrosin kináz se zabývali také Thorarensen a kol.<sup>33</sup> a to konkrétně inhibitory JAK3 kináz. Tato skupina janus kináz (JAK) se vyskytuje zejména v leukocytech. Cílem studie bylo získat co možná nejselektivnější a účinný JAK3 inhibitor. Jako nejúčinnější byla z řady sloučenin zvolena látka znázorněná na Obrázku 22 s  $IC_{50} = 33$  nM, což je oproti ostatním inhibitorům ze skupiny JAK kináz koncentrace výrazně nižší.



Hodnota $IC_{50}$ (nM)			
JAK3	JAK1	JAK2	TYK2
33	>1000	>1000	>1000

**Obrázek 22:** Struktura nového JAK3 inhibitoru, hodnoty  $IC_{50}$  proti jednotlivým skupinám JAK.

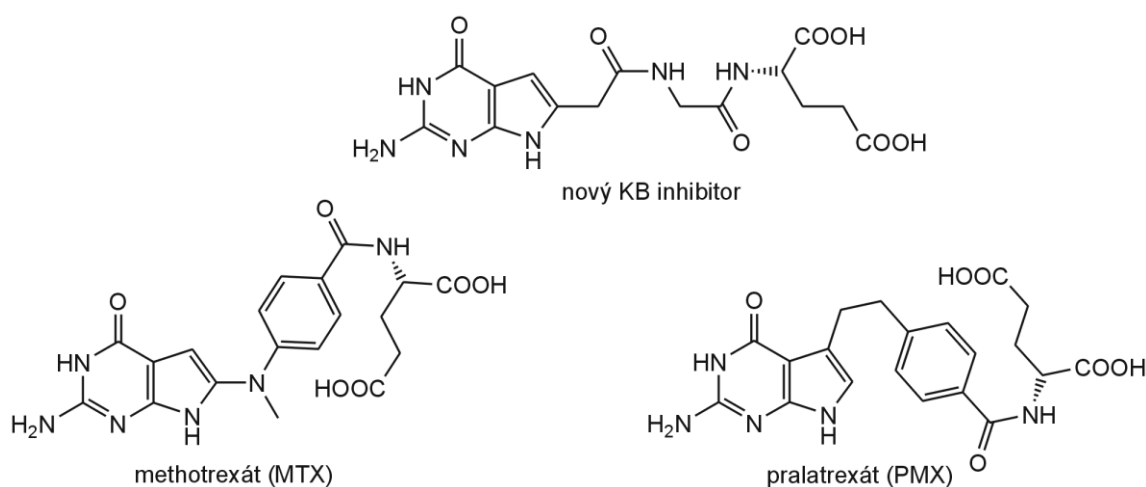
Syntézou derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu substituovaných v polohách 4, 6 a 7, jakožto potencionálních inhibitorů janus kináz 2 (JAK2) se zabývali Wang a kol.<sup>34</sup> Byla připravena řada sloučenin a *in vitro* biologické studie ukázaly, že většina z nich vykazovala silnou inhibiční aktivitu vůči JAK2. Nejsilnější inhibiční aktivitu vůči JAK2 kinázám ( $IC_{50} = 6$  nM, což je 97krát vyšší selektivita ve srovnání s JAK3) vykazovala sloučenina, jejíž strukturální vzorec je uveden na Obrázku 23. Tato látka vykazovala v buněčném testu TF-1 vynikající *in vitro* účinnost proti erytroleukemickým buňkám ( $IC_{50} = 0,14$   $\mu$ M).



**Obrázek 23:** Struktura nového JAK2 inhibitoru.

Syntézou a následným biologickým hodnocením nové řady 6-substituovaných benzoylových a nebenzoylových pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových sloučenin se ve své práci

zabývali Xing a kol.<sup>35</sup> Syntetizované sloučeniny v dřívějších výzkumech vykazovaly antiproliferační účinky proti panelu nádorových buněčných linií včetně KB (buněčná linie rakoviny nosohltanu), SW620 (buněčná linie rakoviny tlustého střeva) a MCF7 (buněčná linie rakoviny prsu), zatímco většina sloučenin z této série vykazovala nanomolární až subnanomolární inhibiční aktivitu jen vůči KB nádorovým buňkám. Nejúčinnější sloučeninou z této řady byl derivát, jehož strukturní vzorec je uveden na Obrázku 24. Tato sloučenina prokázala inhibiční aktivitu proti KB nádorových buněk  $IC_{50} = 0,078$  nM, což je asi 140krát účinnější inhibiční aktivita, než u methotrexátu (MTX)<sup>36</sup> a 1000krát účinnější než u pralatrexátu (PMX)<sup>37</sup>, což jsou nejčastěji používané inhibitory dihydrofolátreduktáz.

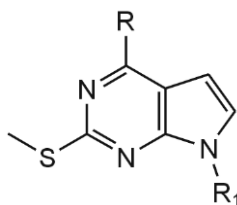


Sloučenina	$IC_{50}$ proti KB buňkám (nM)
nový KB inhibitor	0,078
MTX	10
PMX	70

**Obrázek 24:** Struktura nového KB inhibitoru a srovnání jeho inhibiční aktivita se strukturně podobnými inhibitory.

Musumeci a kol.<sup>38</sup> popsali syntézu a charakterizaci nové řady pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů a jejich aktivitu proti multiformnímu glioblastomu (GBM). SFKs (rodina Src kináz) jsou rodinou cytoplazmatických tyrosin kináz (TK) složených z osmi členů, a to: Src, Fyn, Ano, Blk, Fgr, Hck, Lck a Lyn. Představují konzervovanou strukturu, která zahrnuje *N*-koncovou oblast, dvě Src homologické domény (SH2 a SH3), katalytickou doménu (SH1) a nakonec krátký C-terminální oblast. Mezi SFK se c-Src podílí na cestách, které kontrolují proliferaci buněk, migraci, invazi a angiogenezi. Vysoké hladiny c-Src

v různých nádorech naznačují špatnou prognózu. Nedávno bylo prokázáno, že c-Src je často hyperaktivován nebo nadměrně exprimován právě v GBM nádoru mozku charakterizovaném vysokým stupněm proliferace, angiogeneze, nekrózy a invazivity. Inhibice Src kinázy snížila růst buněk GBM, životaschopnost a migraci, jak *in vitro* tak *in vivo* (na modelech myši). Dokovací studie a MM-GBSA analýza (metoda pro odhad volné energie vazby malých ligandů na biologické makromolekuly) odhalila schopnost studovaných sloučenin účinně interagovat s vazebným místem Src pro ATP. Byly provedeny enzymatické testy pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů proti c-Src a proti panelu kináz (Src, Fyn, EGFR, Kit, Flt3, Abl, AbIT315I), přičemž výsledky ukázaly značně vysokou selektivitu. Nakonec byly provedeny testy *in vitro* cytotoxicity vůči rakovinné buněčné linii mozku U87 GB, které prokázaly, že vůči této buněčné linii je nejaktivnější sloučenina VIII (IC<sub>50</sub> 7,1 μM) (Obrázek 25).



sloučenina	R	R <sub>1</sub>	Src (K <sub>i</sub> , μM)	U87 (IC <sub>50</sub> , μM)
I	NHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1.5±0.10	27.4±0.16
II	NHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>m</i> Cl	CH <sub>2</sub> CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0.7±0.20	143.1±0.20
III	NHCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> CHClC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	6.0±0.08	50.7±0.18
IV	nC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	3.0±0.10	20.7±0.38
V	1-pyrrolidin	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	2.0±0.30	51.8±0.21
VI	1-piperidin	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	2.5±0.30	50.7±0.42
VII	4-morfolin	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	4.7±0.20	20.3±0.15
VIII	NHCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	0.5±0.06	7.1±0.16
IX	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	0.8±0.04	13.3±0.16
X	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> Cl	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - <i>p</i> F	5.0±0.04	43.1±0.08

**Obrázek 25:** Struktura nových inhibitorů Src tyrosin kinázy aktivních proti Glioblastomu.

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

### 3 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ

Teploty tání ( $t_i$ ) byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Monitoring reakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) byl prováděn na deskách typu ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> od firmy Macherey-Nagel. Od stejné firmy byl použit silikagel na sloupcovou chromatografii. Jako mobilní fáze byly použity CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/1, v/v), PE:EA (1/1, v/v). Elementární analýzy (C, H, N) byly provedeny na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental analyzer (Thermo Fischer Scientific). Kvalitativní analýzy byly prováděny na plynových chromatogramech s plamenově-ionizační a s hmotnostně spektrometrickou detekcí. První typ, plynový chromatograf s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID), obsahoval kolonu typu SLB 5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s maximální teplotou 250 °C. Pro analýzy byl zvolen teplotní program: 100 °C/7 min; 250 °C/17 min s teplotou nástřiku 250 °C. Nosný plyn: N<sub>2</sub>/vzduch. Všechny GC-FID analýzy byly provedeny za lineární konstantní rychlosti 65,4 cm/s. Dále byl použit plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS) spojený s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Shimadzu GCMS-QP2010 s kolonou EQUITY 1 (30 m × 0,32 mm × 1,0 μm). Pro analýzy byl zvolen teplotní program: 100 °C/7 min; 30 °C/min s teplotou nástřiku 250 °C. Nosný plyn: He, iontový zdroj: 200 °C, 70 eV. Všechny GC-MS analýzy byly provedeny za lineární konstantní rychlosti 52,4 cm/s. Ve výpisech signálů z hmotnostních spekter jsou uvedeny hodnoty signálů s relativním zastoupením nejméně 5 %, vyjma molekulových iontů. Hodnoty intenzit vybraných fragmentů jsou uvedeny v závorce za hodnotou  $m/z$ . ESI-IT-MS analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru (MS) s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) za použití elektrospreje jako iontového zdroje. Měření byla prováděna jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 μl·min<sup>-1</sup>. Ostatní parametry měření byly: napětí na kapiláře ±4,2 kV; teplota sušícího plynu (220 °C); průtok sušícího plynu (6 dm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>); tlak rozprašovacího plynu (55,16 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci vybraného iontu, měřena za pomoci kolizní indukované disociace (CID), přičemž jako kolizní plyn bylo použito hélium. Analýza látek pomocí infračervené spektroskopie (IR) byla provedena na přístroji Spektrometr FTIR ALPHA – T, Bruker v podobě KBr tablet. Pro popis signálů v IR spektrech byly použity následující zkratky: s (silný), m (střední), w (slabý), b (široký pás).



Vodíková spektra z nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR) byla měřena na přístroji BRUKER ASCEND 500 s pracovní frekvencí 500,11 MHz. Inertními standardy byly rozpouštědla  $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{reziduální CHCl}_3) = 7,27$  ppm;  $\delta(\text{DMSO-}d_5) = 2,50$  ppm. Pro interpretaci vodíkových spekter byly použity následující zkratky: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet). Mikrovlnami asistované syntézy byly realizovány na mikrovlnném reaktoru Discovery SP od firmy CEM. Reakce byly prováděny v roztoku a za zvýšeného tlaku. Podmínky použité pro jednotlivé reakce, budou popsány v diskuzní části této práce.

Výchozí 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin, který sloužil jako výchozí látka, byl zakoupen z komerčních zdrojů a použit bez jakékoliv další purifikace. Totéž platí pro použitá rozpouštědla a reaktanty. Aromatické aminy použité v této práci byly získány z laboratorních zásob Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Alkylace 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu

Výchozí 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**1**) (1,0 g; 6,51 mmol) byl navážen do 100 cm<sup>3</sup> baňky a rozpuštěn v 50 cm<sup>3</sup> dimethylsulfoxidu. Do roztoku byl přidán 2-jodpropan (2,77 g; 16,27 mmol) a v jedné porci uhlíčan draselný (1,35 g; 9,76 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě a průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (chloroform/methanol, 8/1, v/v). Po ukončení reakce byla reakční směs naředěna destilovanou vodou a následně extrahována 6 × 20 cm<sup>3</sup> ethyl-acetátu. Spojené organické podíly byly promyty 2 × 20 cm<sup>3</sup> nasyceného roztoku chloridu sodného a sušeny nad síranem sodným. Po odpaření rozpouštědla na RVO byl surový produkt purifikován sloupcovou chromatografií.

#### 4-Chlor-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**2**)

Čistý produkt byl získán po čištění sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 8/1, v/v) v podobě nažloutlého krystalického prášku ve výtěžku 0,98 g (78 %);  $t_r = 53\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$ .

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1,56 (d, J = 7, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 5,16 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,68 (d, J = 3,65, 1H, C<sup>5</sup>H); 7,41 (d, J = 3,65, 1H, C<sup>6</sup>H); 8,68 (s, 1H, NC<sup>2</sup>HN) ppm. IR (KBr): 3109(w), 2982(w), 1832(w), 1771(m), 1588(s), 1542(s), 1505(m), 1455(m), 1417(m), 1354(s), 1275(m), 1231(m), 925(m), 721(s), 552(m) cm<sup>-1</sup>. GC-MS ( $t_R = 12,5$  min): 197 ((<sup>37</sup>Cl)M<sup>+</sup>, 13), 195 ((<sup>35</sup>Cl)M<sup>+</sup>, 39), 180 (24), 155 (32), 153 (100), 144 (5), 118 (71), 117 (7), 91 (9), 76 (5), 73 (5), 64 (16), 63 (7), 43 (11), 42 (6), 41 (22). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 413,1 [2·(<sup>35</sup>Cl)<sub>2</sub>M+Na]<sup>+</sup> (42); 220 (<sup>37</sup>Cl)[M+Na]<sup>+</sup> (100); 218 (<sup>35</sup>Cl)[M+Na]<sup>+</sup> (100); 198 (<sup>37</sup>Cl)[M+H]<sup>+</sup> (13), 196 [(<sup>35</sup>Cl)M+H]<sup>+</sup> (39).

(C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>) vyp. složení: 55,25 % C; 5,15 % H; 21,48 % N

exp. složení: 55,12 % C; 5,17 % H; 21,40 % N

## 4.2 Nukleofilní aromatická substituce 4-chlor-7-isopropyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu

### 4.2.1 Konvenční syntézy

Sloučenina 1 (100 mg; 0,51 mmol) byl rozpuštěn v 5 cm<sup>3</sup> propan-2-olu ve 25 cm<sup>3</sup> baňce. Následně byl do vzniklého roztoku přidán anilin ve dvoumolárním přebytku a reakční směs byla refluxována při 90 °C pod zpětným chladičem. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Po 23 hodinách byla reakce dokončena, došlo ke změně barvy z čiré na hnědou. Reakční směs byla naředěna destilovanou vodou a následně extrahována 6 × 20 cm<sup>3</sup> ethyl-acetátu. Spojené organické podíly byly promyty 2 × 20 cm<sup>3</sup> nasyceného roztoku chloridu sodného a sušeny nad síranem sodným. Po odpaření rozpouštědla na RVO byl surový produkt purifikován sloupcovou chromatografií.

#### *N*-Fenyl-7-isopropyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (3)

Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě žluto-hnědého krystalického prášku ve výtěžku 85 mg (66 %);  $t_r = 134\text{--}137$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO):  $\delta$  1,45 <sup>MA</sup>(d,  $J = 7$  Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,96 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,8 (d, 1H,  $J = 7$  Hz, 1H, C<sup>5</sup>H); 7 (m, 1H, Ph); 7,33 (m, 2H, Ph-C<sup>4</sup>H); 7,41 (d,  $J = 3,65$ , 1H, C<sup>6</sup>H); 7,87 (m, 2H, Ph); 8,29 (s, 1H, NC<sup>4</sup>NHPh); 9,33 (s, 1H, C<sup>2</sup>H) ppm. IR (KBr): 3475(bw), 3272(m), 3191(m), 3129(m), 3029(m), 2973(m), 1888(w), 3110(w), 1625(s), 1561(s), 1465(s), 1305(s), 1236(m), 755(m), 644(m) cm<sup>-1</sup>. GC-MS ( $t_R = 19,4$  min): 253 (17), 252 (M<sup>+</sup>, 100), 251 (82), 237 (13), 211 (7), 210 (49), 209 (91), 208 (6), 183 (10), 155 (9), 118 (7), 107 (6), 106 (6), 105 (11), 104 (6), 92 (12), 80 (5), 78 (6), 77 (33), 65 (8), 64 (8), 51 (9), 43 (6), 41 (11). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 527,2 [2·M+Na]<sup>+</sup> (4); 275,1 [M+Na]<sup>+</sup> (12); 253,1 [M+H]<sup>+</sup> (100). ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 250,9 [M-H]<sup>-</sup> (100).

(C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>) vyp. složení: 70,87 % C; 5,52 % H; 23,61 % N

exp. složení: 71,11 % C; 5,54 % H; 23,52 % N

#### 4.2.2 Mikrovlnami asistované syntézy

Sloučenina **1** (100 mg; 0,51 mmol) byla rozpuštěna v 6 cm<sup>3</sup> ethanolu v 10 cm<sup>3</sup> zkumavce určené pro mikrovlnné syntézy. K reakční směsi byl přidán dvoumolární přebytek příslušného aromatického aminu. Zkumavka byla uzavřena speciálním septem a vložena do mikrovlnného reaktoru opatřeného teflonovou bezpečnostní nádobou. Reakce byla spuštěna přes software Synergy-D za následujících podmínek: tlak 200 W, teplota 150 °C, čas 15 minut. Po dokončení reakce byla provedena zkouška pomocí TLC vrstvy. Po zchlazení reakční směsi byla tato směs naředěna destilovanou vodou a následně extrahována 6 × 20 cm<sup>3</sup> ethyl-acetátu. Spojené organické podíly byly promyty 2 × 20 cm<sup>3</sup> nasyceného roztoku chloridu sodného a sušeny nad síranem sodným. Po odpaření rozpouštědla na RVO byl surový produkt purifikován sloupcovou chromatografií.

##### *N*-Fenyl-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**3**)

Sloučenina **1** reagovala s anilinem ve dvoumolárním přebytku (0,093 cm<sup>3</sup>). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě žluto-hnědého krystalického prášku ve výtěžku 85 mg (66 %);  $t_t = 134\text{--}137$  °C.

Spektrální charakteristiky v souladu se sloučeninou v kapitole 4.2.1 (str. 35).

##### *N*-(4-Fluorfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**4**)

Sloučenina **1** reagovala s 4-fluoranilinem ve dvoumolárním přebytku (0,098 cm<sup>3</sup>). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě žluto-hnědého krystalického prášku ve výtěžku 115 mg (84 %);  $t_t = 165\text{--}168$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO):  $\delta$  1,45 (d,  $J = 7$  Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,94 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,76 (d,  $J = 3,65$  Hz, 1H, C<sup>5</sup>H); 7,17 (m, 2H, Ph); 7,41 (d,  $J = 3,65$ , 1H, C<sup>6</sup>H); 7,87 (m, 2H, Ph); 8,27 (s, 1H, NC<sup>4</sup>NHPh); 9,33 (s, 1H, C<sup>2</sup>H) ppm. IR (KBr): 3269(bw), 2975(m), 1893(w), 1621(s), 1592(s), 1508(s), 1461(s), 1412(s), 1364(m), 1302(s), 1204(s), 1158(m), 1126(m), 997(m), 900(w), 827(m), 717(s), 639(s), 639(w), 611(m), 510(m), 484(w) cm<sup>-1</sup>. GC-MS ( $t_R=19$  min): 271 (17), 270 (100), 269 (48), 255 (16), 229 (9), 228 (66), 227 (87), 201 (15), 200 (6), 173 (9), 122 (8), 118 (5), 111 (5), 110 (9), 107 (9), 106

(6), 95 (21), 83 (6), 80 (6), 75 (9), 64 (9), 53 (6), 43 (9), 41 (14). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 563,2  $[2 \cdot M + Na]^+$  (4); 293,1  $[M + Na]^+$  (10); 271,1  $[M + H]^+$  (100); ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 268,9  $[M - H]^-$  (100).

(C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>) vyp. složení: 66,65 % C; 5,59 % H; 20,73 % N

exp. složení: 66,65 % C; 5,61 % H; 20,65 % N

#### ***N*-(4-Bromfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (5)**

Sloučenina **1** reagovala s 4-bromanilinem ve dvoumolárním přebytku (176 mg). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě oranžovo-hnědého krystalického prášku ve výtěžku 65 mg (39 %);  $t_r = 168\text{--}170$  °C.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO):  $\delta$  1,45 (d,  $J = 6,75$  Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,96 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,81 (d,  $J = 3,35$  Hz, 1H, C<sup>5</sup>H); 7,45 (d,  $J = 3,65$ , 1H, C<sup>6</sup>H); 7,5 (m, 2H, Ph); 7,9 (m, 2H, Ph); 8,32 (s, 1H, NC<sup>4</sup>NHPh); 9,42 (s, 1H, C<sup>2</sup>H) ppm. IR (KBr): 3261(w), 3174(w), 3079(m), 2982(bm), 1884(w), 1625(s), 1558(s), 1489(s), 1459(s), 1409(s), 1356(s), 1302(s), 1236(s), 1141(w), 1076(w), 998(m), 906(w), 817(m), 798(m), 720(s), 592(w), 525(m), 499(m) cm<sup>-1</sup>. GC-MS ( $t_r = 28,5$  min): 333 (13), 332 (88), 331 (65), 330 (100), 329 (58), 317 (8), 315 (8), 291 (5), 290 (49), 289 (58), 288 (56), 287 (51), 263 (7), 261 (6), 235 (5), 209 (27), 208 (49), 207 (12), 182 (14), 181 (15), 157 (10), 155 (24), 154 (23), 127 (7), 119 (5), 118 (16), 117 (6), 107 (13), 106 (12), 105 (7), 104 (9), 92 (22), 91 (12), 90 (6), 80 (9), 79 (9), 78 (7), 77 (16), 76 (18), 75 (18), 74 (7), 65 (15), 64 (26), 63 (12), 53 (10), 52 (11), 51 (5), 50 (6), 43 (28), 42 (9), 41 (37), 40 (10). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 685,1  $[2 \cdot M + Na]^+$  (3); 355  $[(^{81}\text{Br})M + Na]^+$  (11); 353  $[(^{79}\text{Br})M + Na]^+$  (12); 333,1  $[(^{81}\text{Br})M + H]^+$  (100), 331,1  $[(^{79}\text{Br})M + H]^+$  (97). ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 330,8  $[(^{81}\text{Br})M - H]^-$  (100); 328,8  $[(^{79}\text{Br})M - H]^-$  (100).

(C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BrN<sub>4</sub>) vyp. složení: 54,39 % C; 4,56 % H; 16,92 % N

exp. složení: 54,56 % C; 4,57 % H; 16,86 % N

#### ***N*-(4-Methylfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (6)**

Sloučenina **1** reagovala s 4-methylanilinem ve dvoumolárním přebytku (109 mg). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel,

petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě nažloutlého krystalického prášku ve výtěžku 124 mg (91 %);  $t_t = 145\text{--}148\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO):  $\delta$  1,45 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2,92 (s, 3H,  $\text{PhCH}_3$ ); 4,94 (septet, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 6,75 (d,  $J = 3,65$  Hz, 1H,  $\text{C}^5\text{H}$ ); 7,13 (d,  $J = 8,25$  Hz, 2H, Ph); 7,38 (d,  $J = 3,65$ , 1H,  $\text{C}^6\text{H}$ ); 7,72 (m, 2H, Ph); 8,27 (s, 1H,  $\text{NC}^4\text{NHPh}$ ); 9,19 (s, 1H,  $\text{C}^2\text{H}$ ) ppm. IR (KBr): 2974(bw), 1615(m), 1577(m), 1513(m), 1462(s), 1412(m), 1359(m), 1304(m), 1238(m), 997(w), 783(w), 737(m), 626(w), 513(w)  $\text{cm}^{-1}$ . GC-MS ( $t_R=21,5$  min): 267 (18), 266 (100), 265 (85), 251 (12), 225 (6), 224 (43), 223 (70), 208 (10), 197 (9), 196 (6), 118 (10), 111 (6), 107 (9), 106 (19), 92 (6), 91 (23), 79 (7), 77 (7), 65 (18), 6 (7), 41 (12). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 555,3 [ $2\cdot\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (7); 289,1 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (9); 267,1 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100). ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 264,9 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (100).

( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4$ ) vyp. složení: 72,15 % C; 6,81 % H; 21,04 % N

exp. složení: 71,87 % C; 6,83 % H; 20,96 % N

#### ***N*-(4-Methoxyfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (7)**

Sloučenina **1** reagovala s 4-methoxyanilinem ve dvoumolárním přebytku (126 mg). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě orandžovo-hnědého krystalického prášku ve výtěžku 103 mg (72 %);  $t_t = 124\text{--}128\text{ }^\circ\text{C}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO):  $\delta$  1,45 (d,  $J = 6,7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 3,75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4,96 (septet, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 6,7 (d,  $J = 3,35$  Hz, 1H,  $\text{C}^5\text{H}$ ); 6,93 (m, 2H, Ph); 7,36 (d,  $J = 3,65$ , 1H,  $\text{C}^6\text{H}$ ); 7,69 (m, 2H, Ph); 8,22 (s, 1H,  $\text{NC}^4\text{NHPh}$ ); 9,14 (s, 1H,  $\text{C}^2\text{H}$ ) ppm. IR (KBr): 2977(bs), 1567(s), 1510(s), 1435(s), 1352(s), 1295(s), 1238(s), 1169(m), 1039(s), 1008(m), 911(w), 838(m), 797(m), 719(m), 669(m), 611 (m)  $\text{cm}^{-1}$ . GC-MS ( $t_R=25,4$  min): 283 (19), 282 (100), 281 (41), 268 (12), 267 (62), 240 (21), 239 (15), 226 (6), 225 (38), 224 (6), 197 (6), 196 (6), 120 (12), 118 (23), 108 (30), 108 (5), 92 (10), 91 (6), 77 (8), 65 (6), 64 (13), 41 (13). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 587,3 [ $2\cdot\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (5); 305,1 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (12); 283,1 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (100). ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 280,9 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (6), 265,8 [ $\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3$ ] $^-$  (100)

( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$ ) vyp. složení: 68,06 % C; 6,43 % H; 19,84 % N

exp. složení: 67,79 % C; 6,45 % H; 19,78 % N

***N*-(4-Ethoxyfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (8)**

Sloučenina **1** reagovala s 4-ethoxyanilinem ve dvoumolárním přebytku (0,131 cm<sup>3</sup>). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě světle hnědého krystalického prášku ve výtěžku 80 mg (53 %); *t*<sub>i</sub> = 195–197 °C.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 1,33 (t, *J* = 7,05 Hz, 3H, OCHCH<sub>3</sub>), 1,45 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4 (kvartet, 3H, OCHCH<sub>3</sub>); 4,93 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,67 (d, *J* = 3,35 Hz, 1H, C<sup>5</sup>H); 6,92 (m, 2H, Ph); 7,36 (d, *J* = 3,65, 1H, C<sup>6</sup>H); 7,67 (m, 2H, Ph); 8,22 (s, 1H, NC<sup>4</sup>NHPh); 9,14 (s, 1H, C<sup>2</sup>H) ppm. IR (KBr): 3202(m), 2974(bm), 2928(bm), 1571(s), 1531(m), 1509(s), 1476(w), 1433(s), 1407(m), 1352(m), 1231(s), 1174(m), 1113(m), 1044(m), 1008(m), 923(w), 841(w), 826(m), 785(w), 726(m), 669(m), 576(w), 501(w) cm<sup>-1</sup>. GC-MS (*t*<sub>R</sub> = 28 min): 297 (15), 296 (72), 295 (16), 267 (18), 267 (100), 254 (6), 226 (7), 225 (37), 118 (24), 108 (31), 91 (5), 80 (8), 65 (8), 64 (8), 43 (6). ESI-MS (pos.) *m/z* (%): 615,3 [2·M+Na]<sup>+</sup> (4); 319,1 [M+Na]<sup>+</sup> (9); 297,2 [M+H]<sup>+</sup> (100). ESI-MS (neg.) *m/z* (%): 294,9 [M-H]<sup>-</sup> (100).

(C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O) vyp. složení: 68,89 % C; 6,80 % H; 18,90 % N

exp. složení: 68,66 % C; 6,83 % H; 18,83 % N

***N*-(4-Chlorfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (9)**

Sloučenina **1** reagovala s 4-chloranilinem ve dvoumolárním přebytku (130 mg). Čistý produkt byl získán purifikací pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, petrolether/ethyl-acetát, 1/1, v/v) v podobě bílého krystalického prášku ve výtěžku 59 mg (81 %); *t*<sub>i</sub> = 164–169 °C.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): δ 1,45 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4,96 (septet, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 6,81 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, C<sup>5</sup>H); 7,37 (m, 2H, Ph); 7,44 (d, *J* = 3,65, 1H, C<sup>6</sup>H); 7,9 (m, 2H, Ph); 8,32 (s, 1H, NC<sup>4</sup>NHPh); 9,42 (s, 1H, C<sup>2</sup>H) ppm. IR (KBr): 3278(bw), 2971(s), 1617(s), 1617(s), 1579(s), 1494(s), 1412(s), 1364(s), 1305(s), 1237(s), 1126(m), 1014(m), 996(m), 899(w), 819(m), 716(s), 607(s), 525(m) cm<sup>-1</sup>. GC-MS (*t*<sub>R</sub> = 24,7 min): 288 (32), 287 (35), 286 (100), 285 (59), 271 (15), 246 (21), 245 (33), 244 (65), 243 (74), 217 (9), 209 (7), 208 (23), 182 (8), 181 (5), 155 (8), 154 (7), 138 (5), 127 (6), 122 (5), 118 (9), 113 (6), 111 (19), 107 (10), 106 (8), 92 (8), 91 (6), 80 (6), 79 (6), 77 (6), 75

(15), 65 (7), 64 (13), 63 (6), 53 (7), 52 (6), 43 (13), 42 (5), 41 (20). ESI-MS (pos.)  $m/z$  (%): 595,2  $[2 \cdot M + Na]^+$  (3); 309,1  $[M + Na]^+$  (3); 287,1  $[M + H]^+$  (100). ESI-MS (neg.)  $m/z$  (%): 284,9  $[M - H]^-$  (100).

( $C_{15}H_{15}ClN_4$ ) vyp. složení: 62,83 % C; 5,27 % H; 19,54 % N

exp. složení: 62,60 % C; 5,29 % H; 19,48 % N



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Komentář k diskuzní části diplomové práce

Jelikož předložená diplomová práce navazuje na problematiku, která je na Ústavu chemie studována již několik let, jeví se jako vhodné na tomto místě nastínit, jakým způsobem zapadá do kontextu výzkumu z oblasti syntézy nových purinových derivátů či jeho bioisosterů. Pilotní práci z oblasti 2,6-disubstituovaných purinových sloučenin představuje diplomová práce Davida Gergely<sup>39</sup>, který připravil sérii sloučenin obsahujících v poloze 9 isopropyl a v poloze 6 čtyři různé aromatické aminy obsahující adamantanový skelet. Na tuto práci navázal Filip Zatloukal, který se ve své diplomové práci zabýval syntézou v podstatě stejných látek jako David Gergela, s tím rozdílem, že namísto purinového kruhu použil jeden z jeho bioisosterů, a sice pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin<sup>40</sup>. Předmětné sloučeniny jsou znázorněny na Obrázku 1.

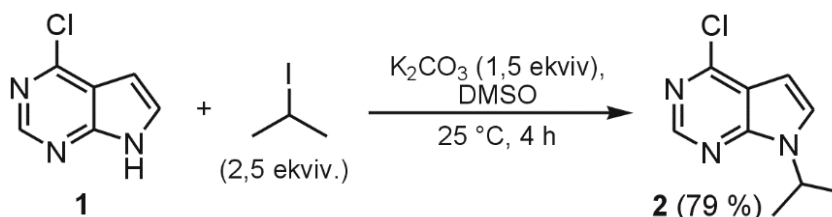
Jako relativně překvapivý se ukázal být fakt, že do dnešního dne bylo v odborné literatuře popsáno velmi málo 4,7-disubstituovaných derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu. Proto bylo rozhodnuto ustoupit od relativně časově náročné syntézy nových sloučenin obsahujících adamantanový motiv a zaměřit se na syntézu nových derivátů tohoto bioisosteru substituovaných běžně dostupnými aromatickými aminy. Paralelně tak byly připraveny dvě série látek, jedna v rámci předložené diplomové práce, druhá je pak součástí práce bakalářské, jejímž autorem je Radim Velecký<sup>41</sup>. Tyto dvě série sloučenin se vzájemně liší pouze substituentem obsaženým v poloze 7, kdy v této diplomové práci je tato poloha obsazena propan-2-yllovým, zatímco v bakalářské práci Radima Veleckého cyklopentylovým substituentem.

Diskuzní část této diplomové práce je rozdělena stejně, jako je tomu v části experimentální. To znamená, že nejprve bude věnována pozornost alkylaci výchozího 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu a následně budou komentovány výsledky reakcí, jejichž cílem bylo provést nukleofilní aromatickou substituci atomu chloru na C4 primárními aromatickými aminy.

## 5.2 Alkylace 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu

První reakcí, která byla provedena, byla alkylace výchozího 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu, a to postupem optimalizovaným v předešlém období, což představovalo velkou výhodu zejména s ohledem na časovou úsporu, jelikož reakční podmínky nemusely být optimalizovány.

Jelikož cílem bylo navázat do polohy 7 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinového skeletu propan-2-ylový substituent, byl jako zdroj tohoto nepolárního a stericky nepříliš objemného uhlovodíku zvolen 2-jodpropan, který se do reakční směsi vkládal v 2,5 molárním přebytku vůči výchozímu chlor derivátu **1**. Samotná reakce probíhala v prostředí dimethylsulfoxidu (DMSO), kdy jako báze byl použit uhličitan draselný, rovněž použitý v nadbytku, tentokrát 1,5 molárním. Reakce byla prováděna za laboratorní teploty a její průběh byl monitorován pomocí TLC (chloroform/methanol, 8/1, v/v). Poté, co byl spotřebován veškerý výchozí pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin, byla reakce ukončena a zpracována. Reakční schéma je znázorněno na Obrázku 26.



**Obrázek 26:** Alkylace 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu.

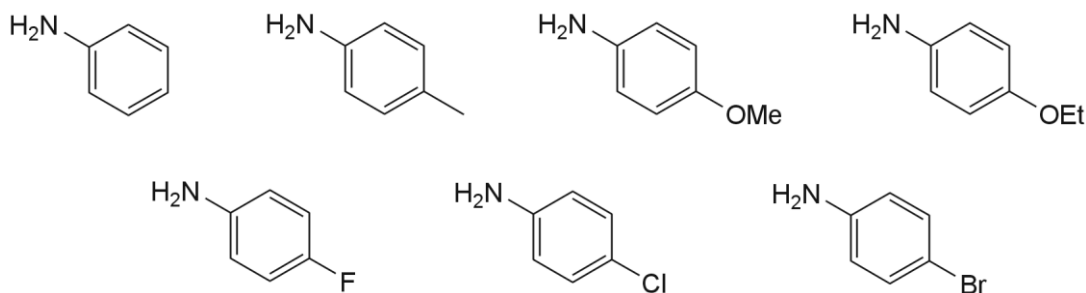
Analýzou GC-MS bylo zjištěno, že se v reakční směsi nachází malé množství (cca 4 %) vedlejšího produktu, jehož molekulární struktura nebyla blíže zkoumána. Po přečištění surové směsi pomocí sloupcové chromatografie, byla opět provedena analýza GC-MS, která prokázala, že získaný produkt je chromatograficky čistý, jelikož v získaném chromatogramu byl pozorován jediný pík. Navíc, z hmotnostního spektra, které bylo pomocí této analýzy rovněž získáno, vyplývalo, že se jedná o požadovaný produkt. Ve spektru byla pozorována dvojice signálů lišících se o 2  $m/z$ , a sice 195 a 197  $m/z$ , které byly ve vzájemném poměru 3:1 (relativní zastoupení těchto signálů v hmotnostním spektru činilo 39 %, resp. 13 %), což odpovídá skutečnosti, že se v dané molekule nachází jeden atom chloru. Je tedy patrné, že atom chloru výchozí sloučeniny **1** na heterocyklickém skeletu, nikterak překvapivě, zůstal. Oba výše zmíněné signály podléhaly fragmentaci za vzniku signálů o  $m/z$  153 a 155, k jejichž vzniku dochází v důsledku neutrální ztráty  $C_3H_6$

(což bude pravděpodobně molekula propenu). Následným odštěpením atomu chloru z posledně jmenovaných signálů pak s největší pravděpodobností vzniká signál o  $m/z$  117.

Struktura látky **2** byla následně potvrzena pomocí dalších metod strukturní analýzy, a sice infračervené spektroskopie (IR), hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) a nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR). S ohledem na skutečnost, že se jedná o sloučeninu, jejíž struktura již byla v literatuře popsána, nebudou výsledky získané pomocí těchto metod na tomto místě blíže diskutovány.  $^1\text{H}$  NMR spektrum sloučeniny **2** je znázorněno v Příloze 3. Výpis spektrálních charakteristik získaných pomocí IR, ESI-MS a  $^1\text{H}$  NMR je uveden v kapitole 4.1.

### 5.3 Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru sloučeniny **2**

Pro získání uvažované série sloučenin bylo nezbytné provést ve druhém reakčním kroku nukleofilní aromatickou substituci atomu chloru nacházejícího se v poloze 4 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinového kruhu. Cílem této práce bylo nahradit již zmiňovaný atom chloru aromatickým aminem. Pro účely této práce bylo zvoleno celkem sedm aromatických aminů vzájemně se lišících substituentem v poloze *para* vůči primární aminoskupině. Vyjma anilinu, který byl použit jakožto modelový substituent sloužící k optimalizaci tohoto reakčního kroku, byly použity aromatické aminy obsahující substituent s různou schopností přitahovat elektrony z aromatického kruhu. Aminem, který obsahuje v poloze *para* substituent, který přitahuje vazebné elektrony slaběji, než atom vodíku (vykazuje tedy kladný indukční efekt) a zvyšuje tak elektronovou hustotu, byl 4-methylanilin. Ostatní použité aromatické aminy vykazují schopnost elektronovou hustotu snižovat a jedná se tedy o substituenty se záporným indukčním efektem. Tato skupina látek byla reprezentována 4-methoxyanilinem, 4-ethoxyanilinem, 4-fluoranilinem, 4-chloranilinem a 4-bromanilinem. Všechny aromatické aminy použité v této práci jsou znázorněny na Obrázku 27.



**Obrázek 27:** Aromatické aminy použité na S<sub>N</sub>Ar atomu Cl.

Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru na purinovém či pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinové skeletu představuje relativně jednoduchou reakci nevyžadující žádné speciální reaktanty či činidla. Na Ústavu chemie je tato reakce dlouhá léta prováděna konvenčním způsobem za atmosférického tlaku, a to buďto v přítomnosti báze (při přípravě 2,6,9-trisubstituovaných purinů), nebo za vyloučení báze a ve větším přebytku příslušného aminu (při syntéze 2,6-disubstituovaných purinů, případně 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů). Značnou nevýhodou takto prováděných reakcí je jejich časová náročnost, kdy jedna reakce trvá až 48 hodin. Z tohoto důvodu, a také s ohledem na nové možnosti syntézy, které se naskytly pořízením nového mikrovlnného reaktoru, se dalším významným cílem této diplomové práce stalo hledání nových možností nukleofilní aromatické substituce atomu chloru, v tomto případě na pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovém skeletu. V rámci řešení předložené diplomové práce tak byly vyzkoušeny celkem tři typy reakcí, přičemž v průběhu ověřování reakčních podmínek byl jako modelový aromatický amin použit anilin. Mezi studované typy reakcí patřily tyto:

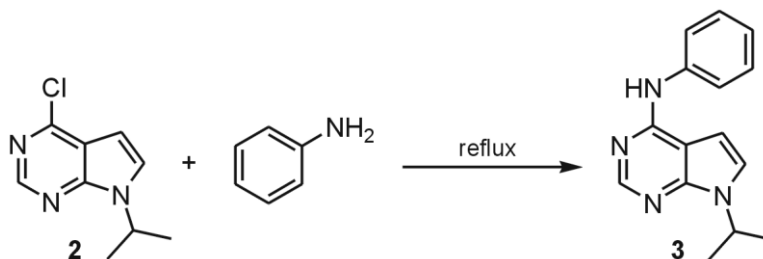
- ▶ konvenční syntéza za atmosférického tlaku;
- ▶ konvenční syntéza za zvýšeného tlaku;
- ▶ mikrovlnami asistovaná syntéza za zvýšeného tlaku.

### 5.3.1 Konvenční syntéza za atmosférického tlaku

Prvním typem experimentu, který byl použit pro výměnu atomu chloru v poloze 4 sloučeniny **2**, byla konvenční syntéza za atmosférického tlaku (Obrázek 29). Jednotlivé reakce byly buďto prováděny v přítomnosti nebo za vyloučení báze, kdy jejich společným rysem bylo refluxování reakční směsi.

Reakce, které byly prováděny v přítomnosti báze (diisopropylethylamin (DIEA) použitý v 1,1 molárním přebytku vůči výchozí sloučenině **2**), nebyly úspěšné, a to ani v případě výměny rozpouštědla, a sice propan-2-olu za ethanol. V těchto reakcích byl aromatický amin (anilin) používán, stejně jako báze, v 1,1 molárním přebytku vůči výchozí sloučenině **2**. Průběh reakcí byl monitorován pomocí TLC, nicméně ani po 48 hodinách nebyl pozorován vznik jakékoliv produktu.

Do reakcí, v nichž nebyla použita báze, byl aromatický amin vkládán ve dvou molárním přebytku vůči výchozí sloučenině **2**. Reakce v prostředí jakéhokoliv z použitých typů rozpouštědel (propan-2-ol, ethanol) probíhaly přibližně 24 hodin. Poté byla reakční směs zpracována, získané organické podíly odpařeny na RVO přečištěny pomocí sloupcové chromatografie. Požadovaný produkt **3** byl získán v uspokojivé čistotě a výtěžcích 66 % (reakce prováděná v propan-2-olu), resp. 56 % (reakce prováděná v ethanolu). Shrnutí nukleofilní aromatické substituce atomu chloru na C4 pomocí anilinu poskytuje Obrázek 28.

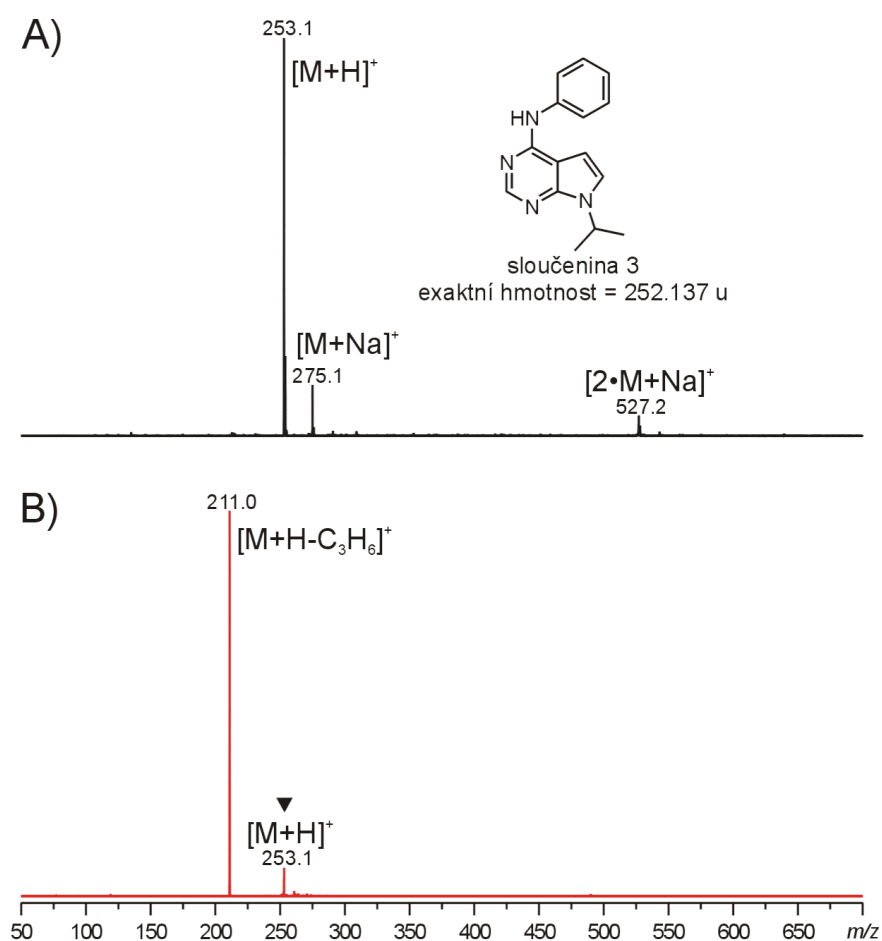


Experiment	Rozpouštědlo	Anilin (ekviv.)	Báze	Čas (h)	Výtěžek (%)
i	iPrOH	2,0	-	24	66
ii	iPrOH	1,1	DIEA	48	-
iii	EtOH	2,0	-	25	56
iv	EtOH	1,1	DIEA	48	-

**Obrázek 28:** S<sub>N</sub>Ar atomu Cl konvenčně za atmosférického tlaku.

Struktura sloučeniny **3** byla potvrzena pomocí běžně používaných metod strukturní analýzy, tj. MS, NMR (Příloha 4) a IR. Na Obrázku 29 jsou uvedena spektra získaná pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu (Obrázek 29A) byly pozorovány celkem tři signály identifikované jako protonovaná molekula [M+H]<sup>+</sup>, sodný adukt sloučeniny **3** [M+Na]<sup>+</sup> a sodný adukt dimeru sloučeniny **3** [2·M+H]<sup>+</sup>. Izolací a následnou fragmentací

signálu o  $m/z$  253 (ESI-MS/MS) za podmínek kolizí indukované disociace (CID, z angl. collision induced dissociation) bylo dále zkoumáno chování sloučeniny **3** v plynné fázi. Navíc, výsledky získané tandemovou hmotnostní spektrometrií mohou být velmi nápomocné při potvrzování molekulární struktury dané sloučeniny. Při fragmentaci iontu  $[M+H]^+$  byl v MS/MS spektru pozorován jedenkrát nabitý signál o  $m/z$  211 vznikající neutrální ztrátou částice o  $m/z$  42 odpovídající sumárnímu vzorci  $C_3H_6$  (Obrázek 29B). S největší pravděpodobností se jedná o propen, k jehož vzniku došlo v důsledku rozštěpení N–C vazby mezi pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovým skeletem a propan-2-ylem substituovaným na N7.



Obrázek 29: Výsledek ESI-MS/MS analýzy sloučeniny **3**.

### 5.3.2 Konvenční syntéza za zvýšeného tlaku

Jelikož výsledky komentované v předcházející kapitole nebyly uspokojivé, a to jak ve smyslu délky reakční doby, tak také výtěžků, v nichž byl požadovaný produkt vyzolován, bylo rozhodnuto provést nukleofilní aromatickou substituci atomu atomu Cl

v poloze 4 sloučeniny **2** pomocí konvenční syntézy za zvýšeného tlaku. Pro tyto účely byla použita speciální tlustostěnná uzavíratelná reakční zkumavka (Příloha 1), ve které je možné provádět syntézy až do tlaku 12 atmosfér.

Provedeno bylo celkem dvanáct reakcí, které byly co do podmínek analogické jako v případě konvenční syntézy za atmosférického tlaku, samozřejmě s tím rozdílem, že byly prováděny za tlaku zvýšeného. Podle typu použitého rozpouštědla byla zvolena rozdílná teplota, při níž byly jednotlivé reakce prováděny, kdy v případě propan-2-olu to bylo 100 °C, zatímco byl-li jako rozpouštědlo použit ethanol, činila teplota 114 °C. Cílem bylo, aby ve všech případech bylo v reakční nádobě dosaženo tlaku přibližně 4 atmosfér.

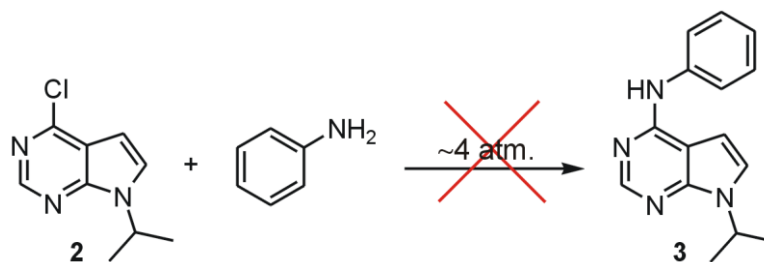
Hodnota maximální teploty, na kterou lze zkumavku s reakční směsí zahřát, byla vypočítána pomocí Antoineovy rovnice (1.1), kterou vypočítáme tlak nasycených par rozpouštědla, přičemž hodnoty A, B a C jsou konstanty rozpouštědla, a pomocí rovnice odvozené z Gay-Lucasova zákona (1.2), jenž slouží pro výpočet tlaku plynu nad kapalinou. Spojením dvou zmíněných rovnic lze získat vztah (1.3) pro výpočet teploty, pod kterou lze reakci bezpečně provést.

$$\log_{10} p^s = \frac{A - B}{C + t} \quad (1.1)$$

$$p_2 = T_2 * \frac{p_1}{T_1} \quad (1.2)$$

$$p_2 = T_2 * \frac{p_1}{T_1} + 10^{\frac{A-B}{C+T}} \quad (1.3)$$

Jednotlivé reakce, ať za použití báze či většího přebytku aromatického aminu, byly prováděny po dobu 4, 8 a 12 hodin, kdy po uplynutí této doby byla reakční směs ponechána vychladnout na laboratorní teplotu (cca 60 minut), ihned poté byl připraven vzorek, který byl zanalyzován na GC-MS. Zdá se býti poněkud překvapující, že v žádném z provedených experimentů nebyl v chromatogramu pozorován pík odpovídající požadovanému produktu. Detekovány byly pouze píky náležící anilinu a výchozímu pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu **2**. Obecné schéma uskutečněných experimentů je znázorněno na Obrázku 30, pod nímž jsou podmínky, při nichž byly experimenty prováděny, blíže specifikovány.



Experiment	Rozpouštědlo	Anilin (ekviv.)	Báze	Čas (h)
i	iPrOH	2,0	-	4
ii	iPrOH	2,0	-	8
iii	iPrOH	2,0	-	12
iv	iPrOH	1,1	DIEA	4
v	iPrOH	1,1	DIEA	8
vi	iPrOH	1,1	DIEA	12
vii	EtOH	2,0	-	4
viii	EtOH	2,0	-	8
ix	EtOH	2,0	-	12
x	EtOH	1,1	DIEA	4
xi	EtOH	1,1	DIEA	8
xii	EtOH	1,1	DIEA	12

Obrázek 30:  $S_NAr$  atomu Cl konvenčně za zvýšeného tlaku.

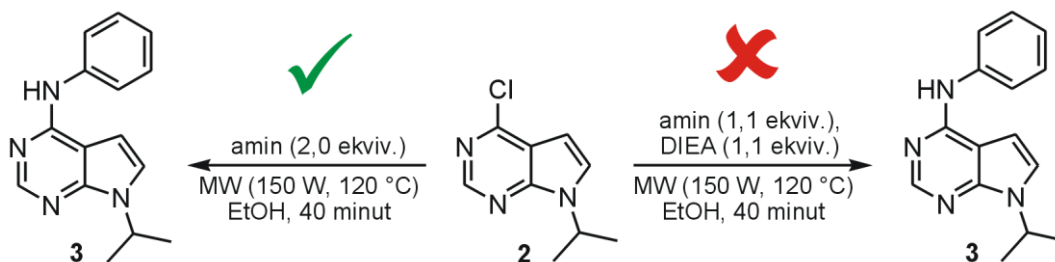
### 5.3.3 Mikrovlnami asistovaná syntéza

S ohledem na výsledky získané pomocí syntetických postupů uvedených v předcházejících dvou kapitolách, ale zejména pak na aktuálně se naskytující možnost vyplývající z pořízení mikrovlnného reaktoru pro syntézu na Ústav chemie FT UTB ve Zlíně, bylo rozhodnuto vyzkoušet nukleofilní aromatickou substituci právě pomocí této bezesporu efektivní metody. Pro tyto účely byl použit mikrovlnný reaktor Discover od firmy CEM. Na tomto místě se jako velice důležité jeví uvést, že veškeré mikrovlnami asistované syntézy prováděla, po prvotním proškolení, autorka práce zcela samostatně.

První experiment byl proveden podle postupu uvedeného v literatuře [26], kdy byl do reakční směsi vložen jak aromatický amin (opět modelový anilin), tak také báze (diisopropylethylamin, DIEA) v 1,1 molárním přebytku vůči výchozímu purinu **2**. Reakce probíhala v prostředí ethanolu při teplotě 120 °C a maximálního výkonu 150 W po dobu 10 až 40 minut (Obrázek 31). Okamžitou analýzou reakční směsi pomocí GC-FID bylo



v řádech několika desítek minut po ukončení dané reakce zřejmé, zda byl experiment úspěšný či nikoliv. Nutno podotknout, že před první „ostrou“ analýzou provedenou na GC-FID, byly proměřeny standardy všech použitých reaktantů, tedy výchozího chlor derivátu **2**, aromatického aminu (anilin) a požadovaného produktu. Ani v jednom případě však nebyl v chromatogramu pozorován pík s retenčním časem odpovídajícím požadovanému produktu.



**Obrázek 31:** Mikrovlnami asistovaná  $S_NAr$  atomu Cl za použití/vyloučení báze.

S ohledem na výše uvedené bylo rozhodnuto od tohoto typu postupu dále upustit a soustředit se pouze na postup za vyloučení báze, kdy byl aromatický amin do reakční směsi vkládán ve dvou molárním přebytku. Ostatní podmínky byly stejné, jako tomu bylo v předcházejícím případě, s tím rozdílem, že reakce probíhala 40 minut (Obrázek 31). Analýza GC-FID potvrdila vznik očekávaného produktu **3**, kdy pík odpovídající této látce ( $t_R = 21,4$  minut) byl v chromatogramu pozorován, přičemž jeho relativní zastoupení, dle integrální intenzity plochy píku, činilo 74 %.

Následně byla provedena řada experimentů, jejichž cílem bylo zoptimalizovat podmínky mikrovlnami asistované syntézy tak, aby byl očekávaný produkt získán v co možná nejvyšším výtěžku a nejkratším čase (přeci jen 40 minut se zdálo být na tento typ syntézy poněkud hodně).

Jako první byl studován vliv použitého typu rozpouštědla a výkonu na průběh reakce. Použity byly celkem tři typy rozpouštědel, a sice ethanol a propan-2-ol, jakožto zástupci protických polárních rozpouštědel (používané také při konvenčních syntézách) a dimethylsulfoxid (DMSO), rozpouštědlo polární aprotické. Reakce byly prováděny při teplotě 120 °C po dobu 40 minut. Následně byla reakční směs podrobena analýze pomocí GC-FID. V Tabulce 1 jsou získané výsledky shrnuty, přičemž v posledních třech sloupcích je uvedeno relativní zastoupení, dle integrální intenzity plochy píku v procentech, pro

všechny tři použité reaktanty, tedy anilin, chlor derivát **2** a požadovaný produkt **3**. Z Tabulky je patrné, že DMSO se nejví pro potřeby této reakce jako vhodné, kdy ani při použití nejvyššího výkonu (200 W) nedošlo k úplnému zreagování výchozí sloučeniny. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo v případě obou protických polárních rozpouštědel, přičemž jako vhodnější byl nakonec vybrán ethanol. Ten byl používán ve všech dalších optimalizačních reakcích.

**Tabulka 1:** Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy I.

Rozpouštědlo	Výkon (W)	Teplota (°C)	Čas (min)	GC-FID (%) <sup>a</sup>		
				Anilin	Slč. 2	Produkt
EtOH	100	120	40	26	2	72
EtOH	150	120	40	25	1	74
EtOH	200	120	40	20	1	79
iPrOH	100	120	40	26	4	70
iPrOH	150	120	40	21	5	74
iPrOH	200	120	40	25	4	71
DMSO	100	120	40	40	24	36
DMSO	150	120	40	31	14	55
DMSO	200	120	40	25	9	66

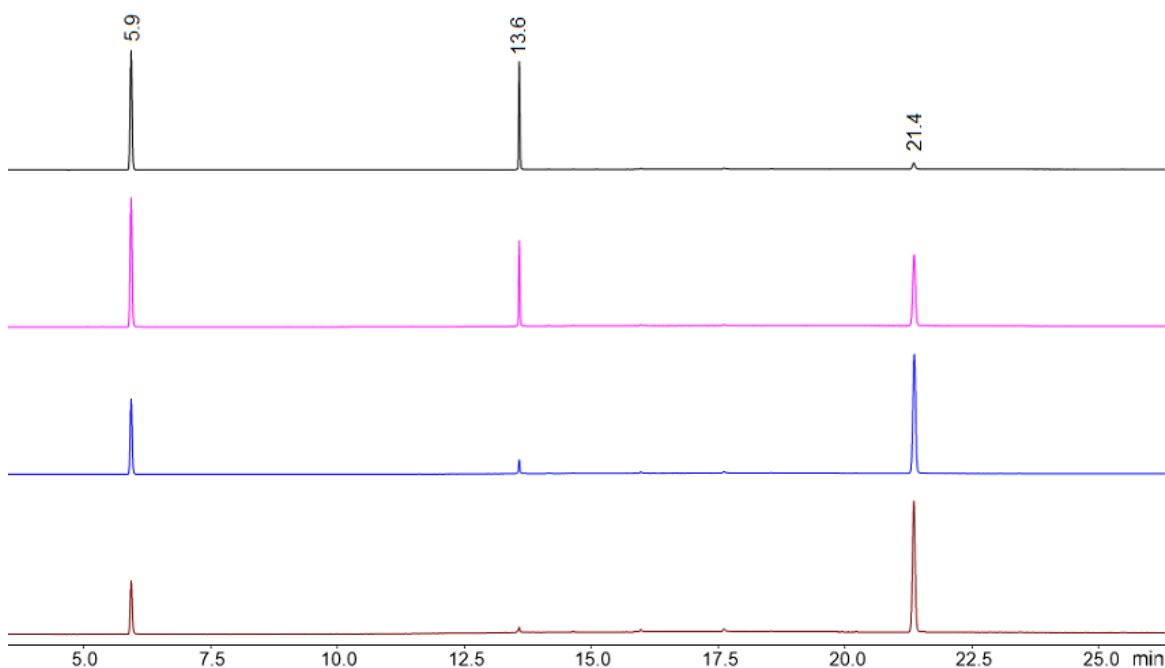
<sup>a</sup> relativní zastoupení dle integrální intenzity plochy píku

Následně bylo přistoupeno ke studiu vlivu maximálního výkonu na průběh reakce, kdy byly zvoleny tři hodnoty, a sice 100, 150 a 200 W. Jednotlivé reakce byly prováděny po dobu 10, 20, 30 a 40 minut. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2, kdy je patrné, že nejrychleji byla výchozí látka spotřebovávána při nejvyšším použitém výkonu (200 W), kdy již po 30 minutách zbývalo v reakční směsi přibližně 4 % výchozí látky (dle GC-FID). Ačkoliv po 40 minutách se zdály být získané výsledky při daných výkonech velmi podobné, tak s ohledem výše uvedené (rychlost průběhu reakcí při různém výkonu), byl jako nejvhodnější zvolen výkon o hodnotě 200 W.

Tabulka 2: Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy II.

Výkon (W)	Rozpouštědlo	Teplota (°C)	Čas (min)	GC-FID (%) <sup>a</sup>		
				Anilin	Slč. 2	Produkt
100	EtOH	120	10	59	40	1
			20	54	34	12
			30	32	11	57
			40	26	2	72
150	EtOH	120	10	58	39	3
			20	48	30	22
			30	26	9	65
			40	20	2	78
200	EtOH	120	10	59	36	5
			20	44	20	36
			30	28	4	68
			40	22	1	77

<sup>a</sup> relativní zastoupení dle integrální intenzity plochy píku



**Obrázek 32:** Výsledky GC-FID analýzy reakčních směsí získaných MW syntézou (EtOH, 200 W, 120 °C) po 10, 20, 30 a 40 minutách (černá - 10 min, růžová - 20 min, modrá - 30 min, hnědá - 40 min).

Na Obrázku 32 jsou uvedeny chromatogramy získané metodou GC-FID analyzovaných reakčních směsí pocházejících z reakcí prováděných v ethanolu při maximálním výkonu 200 W, teplotě 120 °C a čase 10 (černá), 20 (růžová), 30 (modrá) a 40

(hnědá) minut. Retenční časy pro jednotlivé sloučeniny byly následující: anilin (5,9 min), sloučenina **2** (13,6 min) a požadovaný produkt **3** (21,4 min). Z obrázku je patrný úbytek výchozího chlor derivátu **2** a zároveň nárůst intenzity píku odpovídajícího požadovanému produktu **3**.

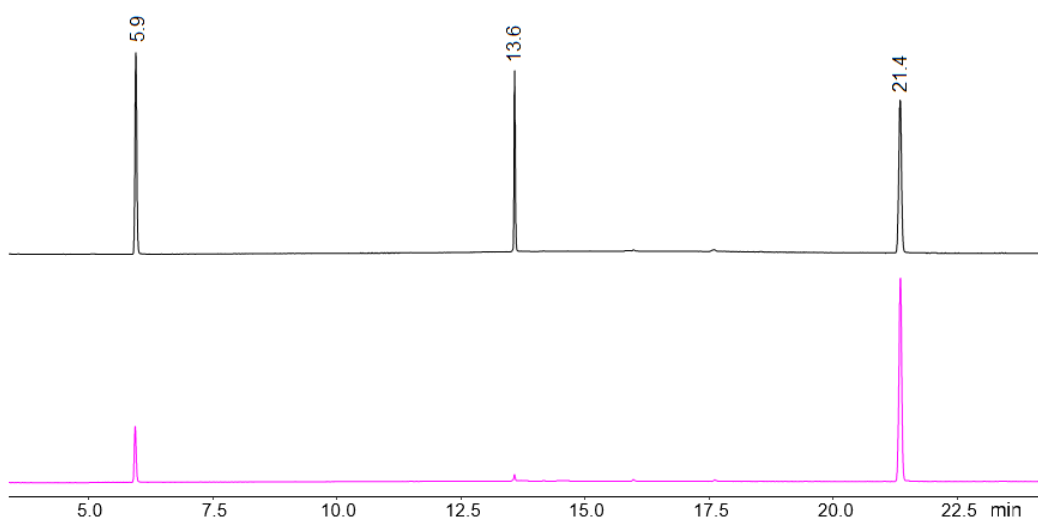
Poté, co byl jako nejvhodnější rozpouštědlo zvolen ethanol a nejlépe se jeví maximální výkon 200 W, bylo přistoupeno ke studiu vlivu teploty na průběh reakce. Jednotlivé reakce byly prováděny při teplotách 100, 110, 120, 130, 140 a 150 °C, kdy délka reakce činila 10, 20, 30 a 40 minut. Získané výsledky jsou sumarizovány v Tabulce 3, přičemž je patrné, že teplota, při níž byly reakce prováděny, měla na jejich průběh značný vliv. Jinými slovy, s rostoucí teplotou byl průběh reakce rapidnější a ke spotřebování výchozí látky (tedy chlor derivátu **2**) došlo v kratším čase.

**Tabulka 3:** Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy III.

Teplota (°C)	Výkon (W)	Rozpouštědlo	Čas (min)	GC-FID (%) <sup>a</sup>		
				Anilin	Slč. 2	Produkt
<b>100</b>	200	EtOH	10	61	37	2
			20	60	37	3
			30	57	34	9
			40	48	24	28
<b>110</b>	200	EtOH	10	60	37	3
			20	57	36	7
			30	46	25	29
			40	30	12	58
<b>120</b>	200	EtOH	10	59	36	5
			20	44	20	36
			30	28	4	68
			40	22	1	77
<b>130</b>	200	EtOH	10	52	35	13
			20	27	12	61
			30	15	2	83
			40	14	1	85
<b>140</b>	200	EtOH	10	36	22	42
			20	16	1	83
			30	16	1	83
			40	18	1	81
<b>150</b>	200	EtOH	10	40	13	47
			20	26	0	74
			30	26	0	74
			40	26	0	74

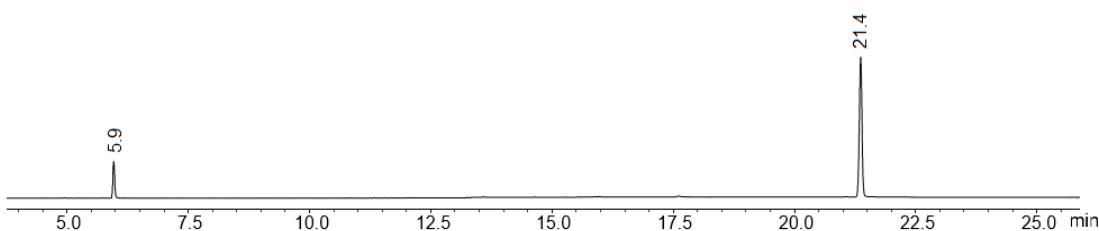
<sup>a</sup> relativní zastoupení dle integrální intenzity plochy píku

Jako příklad lze uvést teplotu 140 °C, při jejímž použití bylo v reakční směsi po 10 minutách pouze 22 % výchozí látky, zatímco při teplotách 100–130 °C to bylo přibližně 36 %. Na druhou stranu, ani při teplotě 140 °C nedošlo k úplnému zreagování výchozí látky, kdy její relativní zastoupení v reakční směsi činilo od 20 do 40 minuty pouhé 1 %. To je patrné také z chromatogramů uvedených na Obrázku 33.



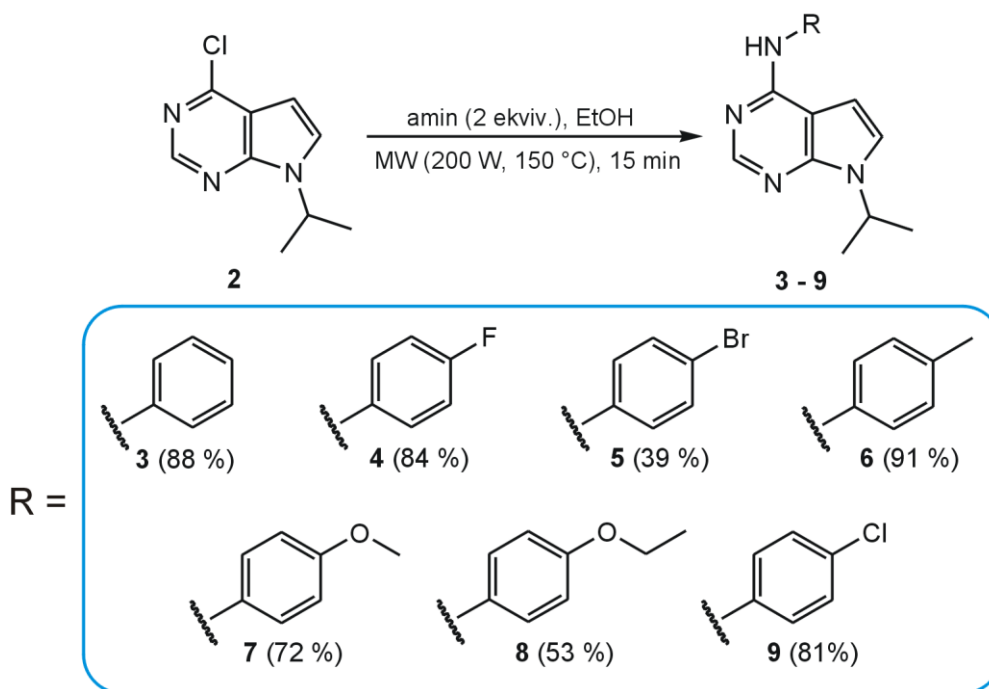
**Obrázek 33:** Výsledky GC-FID analýzy reakčních směsí získaných MW syntézou (EtOH, 200 W, 140 °C) po 10 a 40 minutách (černá - 10 min, růžová - 40 min).

Jako nejlepší se tak jevila nejvyšší použitá teplota, tedy 150 °C, při jejímž použití činilo po 10 minutách relativní zastoupení výchozího chlor derivátu **2** jen 13 %. Po 20 minutách již nebyla výchozí látka v reakční směsi obsažena vůbec, proto byla zkrácena reakční doba na 15 minut, přičemž analýzou GC-FID bylo zjištěno, že se výchozí sloučenina v reakční směsi nenachází (detekovány byly pouze píky odpovídající svými retenčními časy anilin a požadovaný produkt **3**). Předmětný chromatogram je znázorněn na Obrázku 34.



**Obrázek 34:** Výsledek GC-FID analýzy reakční směs získané MW syntézou (EtOH, 200 W, 150 °C, 15 minut).

Poté, co byly ukončeny optimalizační experimenty, bylo přistoupeno k syntéze uvažovaných sloučenin. Podmínky, jakož i výtěžky, v nichž byly jednotlivé sloučeniny získány (po purifikaci sloupcovou chromatografií), jsou znázorněny na Obrázku 35.

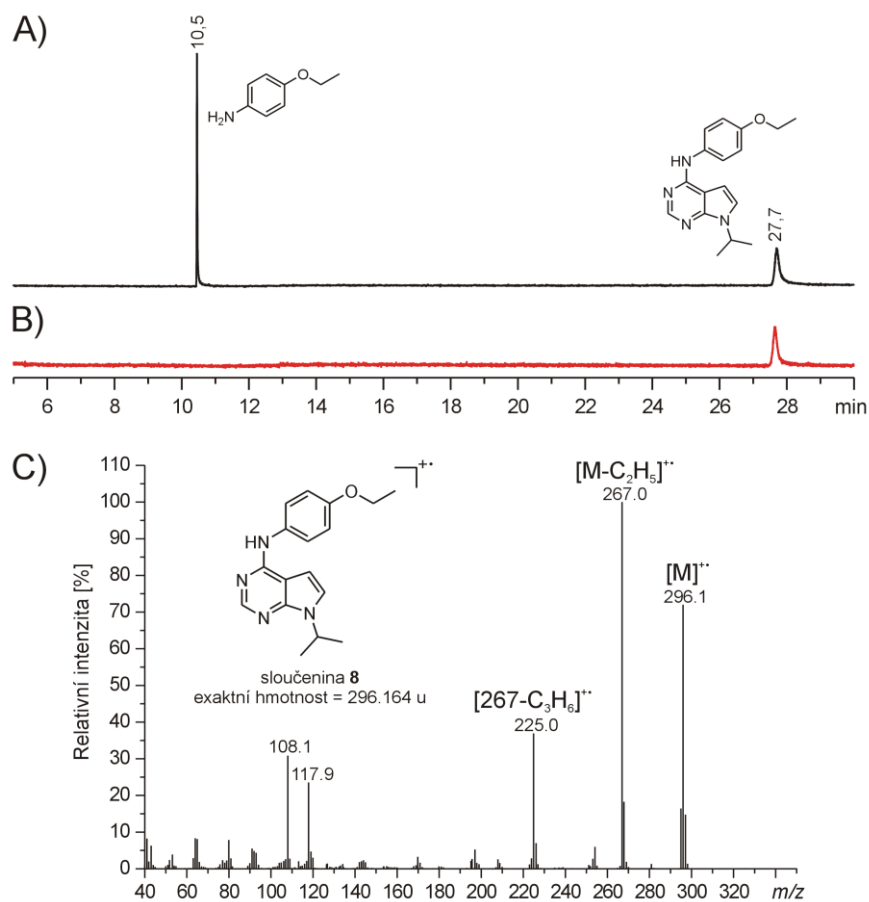


**Obrázek 275:** Mikrovlnami asistovaná syntéza nových derivátů pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu.

Jak je z Obrázku 36 patrné, čtyři ze sedmi syntetizovaných látek (sloučeniny **3**, **4**, **6** a **9**) byly získány ve výborných výtěžcích, vyšších než 80 %. Methoxyderivát **7** byl izolován v uspokojivém výtěžku 72 %. Poněkud překvapující byla skutečnost, že výtěžek sloučeniny **8** činil pouze 53 %. Tato reakce byla, pro jistotu, provedena opakovaně, vždy s velmi podobným výtěžkem pohybujícím se v rozmezí 50–53 %. S ohledem na skutečnost, že GC-MS analýza reakční směsi provedená bezprostředně po ukončení reakce neprokázala přítomnost výchozího chlor derivátu **2**, bude nízký výtěžek, v níž byla požadovaná sloučenina **8** získána, ovlivněn buďto postupem při zpracování reakční směsi, případně v průběhu čištění surového produktu pomocí sloupcové chromatografie. Podobný výsledek byl i v případě sloučeniny **5**. Tato sloučenina byla izolována ve výtěžku pouze 39 % a proto byla taktéž reakce provedena znovu, avšak s výtěžkem ještě menším (35 %). Důvodem bude zřejmě tvorba sraženiny ihned po dokončení reakce.

Struktura připravených sloučenin byla navržena pomocí běžných metod strukturní analýzy, konkrétně pak infračervené spektroskopie, hmotnostní spektrometrie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Níže budou popsány výsledky získané pomocí GC-MS, ESI-MS a  $^1\text{H}$  NMR pro sloučeninu **8**.

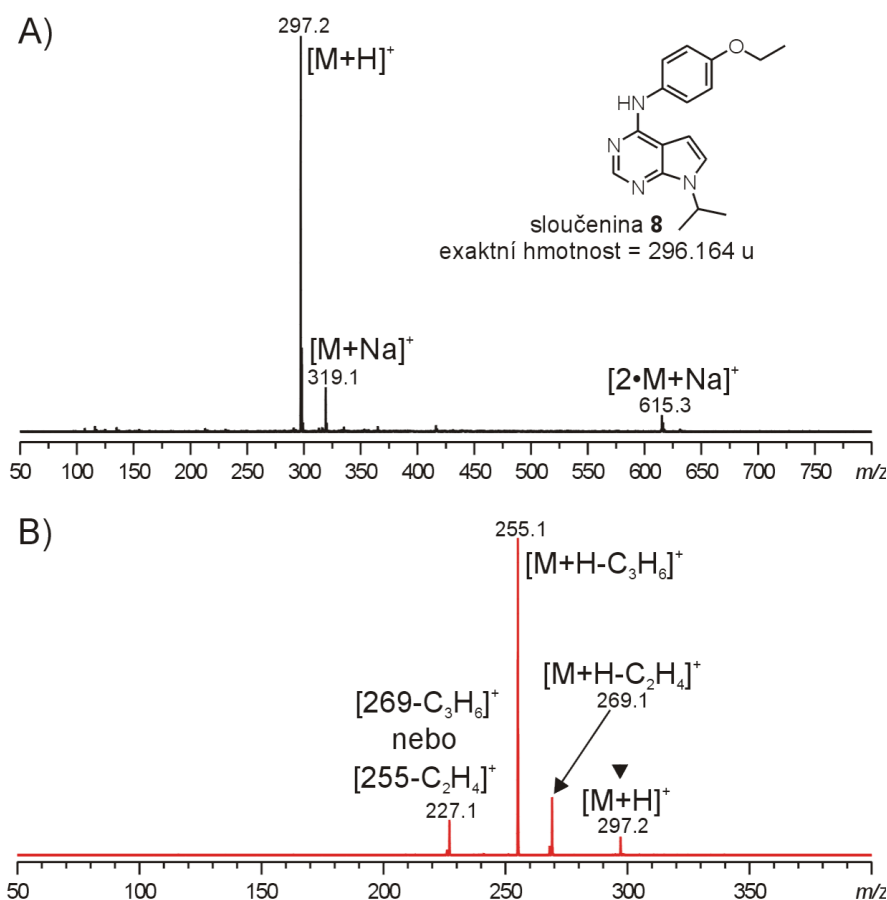
Jako první bylo nebytné potvrdit, zda je po provedení sloupcové chromatografie, požadovaný produkt chromatograficky čistý tzn., zda byl v průběhu čištění oddělen veškerý nezreagovaný aromatický amin, v tomto případě tedy 4-ethoxyanilin. Na Obrázku 36A je znázorněn chromatogram surové reakční směsi analyzované bezprostředně po ukončení mikrovlnami asistované syntézy pomocí GC-MS. V chromatogramu lze pozorovat dva píky s retenčním časem 10,5 minuty a 27,7 minuty, které byly pomocí studia získaných EI-MS spekter charakterizovány jako 4-ethoxyanilin a požadovaný produkt **8**. Následovalo čištění surového produktu pomocí sloupcové chromatografie a analýza jednotlivých izolovaných frakcí. Na Obrázku 36B je uveden chromatogram, který lze považovat za jednoznačný důkaz úspěšnosti sloupcové chromatografie, poněvadž v něm byl pozorován pouze jediný pík s retenčním časem odpovídajícím požadovanému produktu. Nezreagovaný aromatický amin byl tedy úspěšně oddělen. Na Obrázku 36C je EI-MS spektrum sloučeniny **8**, v němž lze, vyjma signálu o  $m/z$  296 odpovídajícímu molekulovému iontu, pozorovat také signály vznikající v důsledku fragmentace (což je pro EI-MS typické). Konkrétně to byly ionty o  $m/z$  267 a 225 vznikající pravděpodobně po sobě jdoucí fragmentaci v důsledku ztráty  $\text{C}_2\text{H}_5$  z molekulového iontu, následovanou ztrátou  $\text{C}_3\text{H}_6$  z iontu 267  $m/z$  za vzniku iontu o  $m/z$  225.



**Obrázek 36:** GC-MS analýza sloučeniny **8**. A) část chromatogramu surové reakční směsi, B) část chromatogramu po čištění sloupcovou chromatografií, C) EI-MS spektrum.

Struktura sloučeniny **8** byla navržena také na základě výsledků získaných pomocí ESI-MS analýzy. Ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu (Obrázek 37A) byly pozorovány celkem tři signály určené jako protonovaná molekula  $[M+H]^+$ , sodný adukt sloučeniny **8**  $[M+Na]^+$  a sodný adukt dimeru sloučeniny **8**  $[2\cdot M+H]^+$ . Izolací a následnou fragmentací iontu  $[M+H]^+$  za podmínek kolizí indukované disociace bylo studováno chování sloučeniny **8** v plynné fázi, stejně jako získávány dodatečné informace sloužící k určení (potvrzení) molekulární struktury této látky. Z Obrázku 37B je patrné, že při fragmentaci sloučeniny **8** byly pozorovány dvě možné fragmentační dráhy, vyznačující se buďto neutrální ztrátou  $C_2H_4$ , která byla následovaná ztrátou  $C_3H_6$ , případně došlo ke zmíněným ztrátám v opačném pořadí. Obě fragmentační dráhy byly potvrzeny fragmentací ( $MS^3$ ) iontů o  $m/z$  269 a 255.

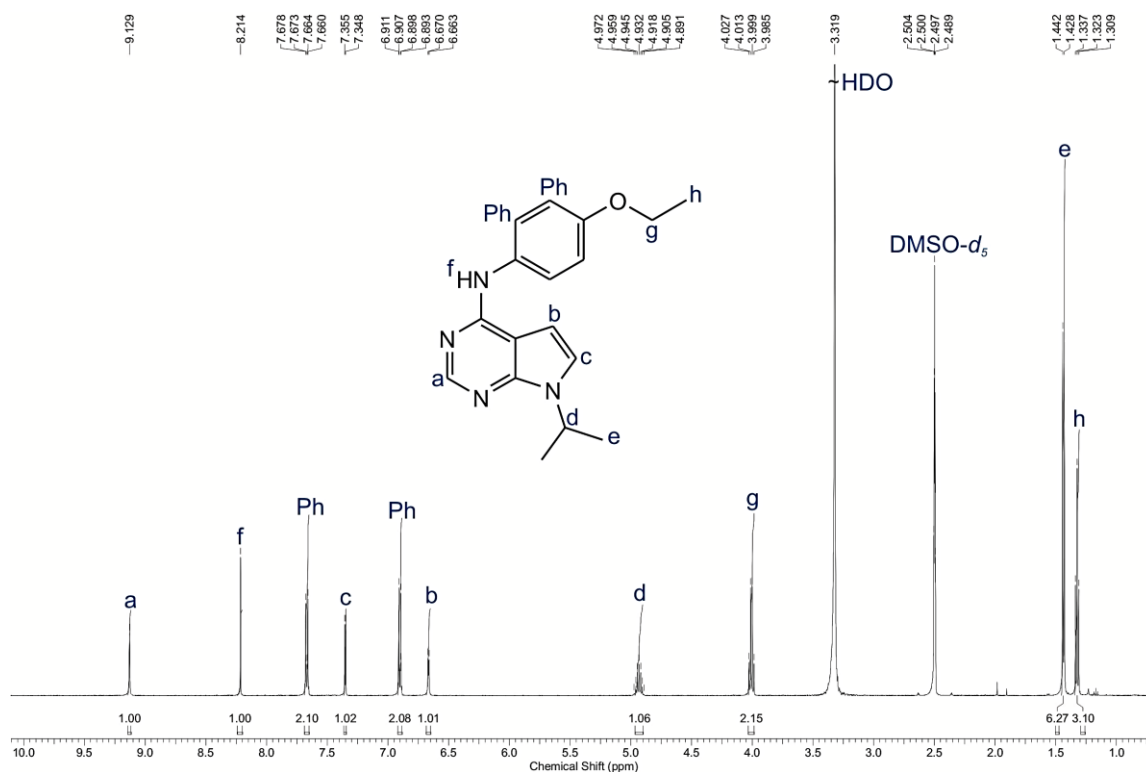




**Obrázek 37:** ESI-MS/MS spektra sloučeniny **8**. A) ESI-MS, B) ESI-MS/MS iontu  $[M+H]^+$ .

V  $^1\text{H}$  NMR spektru sloučeniny **8** (Obrázek 38) bylo pozorováno celkem deset signálů, což přesně odpovídá počtu předpokládanému. Na tomto místě, ještě před samotným komentářem ke spektru samotnému, je nezbytné uvést, že všechna spektra byla měřena v prostředí deuterovaného dimethylsulfoxidu ( $\text{DMSO-}d_6$ ), což představuje zásadní rozdíl od výsledků prezentovaných v diplomové práci Filipa Zatloukala<sup>40</sup>, kde byla veškerá měření uskutečněna v deuterovaném chloroformu, přičemž ve spektrech 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů, které byly v rámci diplomové práce Filipa Zatloukala připraveny, byly pozorovány dvojice signálů, o nichž se lze domnívat, že jsou atropoisomerní. Uvedená změna rozpouštědla vedla k tomu, že tyto atropoisomerní signály pozorovány nebyly. Důvody pro tento jev lze spatřovat v rozdílné velikosti obou molekul rozpouštědla a jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Protože však prozatím nebyly provedeny žádné detailnější experimenty (např. vliv teploty měření v  $\text{CDCl}_3$  na intenzitu dvojic signálů), bylo by formulování jakýchkoliv závěrů na tomto místě čirou spekulací.

V alifatické oblasti  $^1\text{H}$  NMR spektra látky **8** byly pozorovány celkem tři signály. Prvním z nich byl triplet v oblasti 1,3 ppm náležící atomům vodíku methylové skupiny ethoxylového substituentu navázaného na fenylovém kruhu (na Obrázku 38 označeny písmenem „h“). Dublet s posunem 1,4 náleží atomům vodíku z methylových skupiny propan-2-ylvého substituentu vázaného v poloze 7 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinového kruhu (atomy vodíku označeny jako „e“). Atomy vodíku  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  pocházející z ethoxylového substituentu (označeny jako „g“) byly pozorovány v oblasti 4,0 ppm. Septet náležící atomu vodíku  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$  vykazoval očekávaný posun v oblasti 4,9 ppm. V aromatické oblasti pak byly pozorovány signály náležící fenylovému kruhu substituovanému v poloze *para*, a to v podobě dvojice dubletů (6,9 resp. 7,7 ppm). Signály atomů vodíku navázaných na heterocyklický systém jsou ve spektru označeny písmeny „a“, „b“ a „c“. V neposlední řadě byl ve spektru pozorován signál atomu vodíku  $\text{C}^4\text{NHPH}$ , a to s posunem 8,2 ppm (signál označený písmenem „f“).  $^1\text{H}$  NMR spektra sloučenin **4**, **5**, **6**, **7** a **9** jsou znázorněna v Přílohách 5–9.



Obrázek 38:  $^1\text{H}$  NMR spektrum sloučeniny **8**.

## ZÁVĚR

V rámci předložené diplomové práce jsou popsány a diskutovány výsledky optimalizace přípravy látek s pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovým skeletem, obsahující ve své struktuře aromatické aminy a dále pak výsledky syntézy nových, doposud nepopsaných 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů.

Nezbytnou součástí práce pro získání finálních látek byla příprava alkylovaného pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu **2**, který později sloužil jako výchozí sloučenina pro přípravu 4,7-disubstituovaných purinů. Sloučenina **2** byla připravena reakcí komerčně dostupného 4-chlor-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (**1**) s 2-jodpropanem v prostředí DMSO a přítomnosti uhličitanu draselného.

Další důležitou částí práce byla nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze 4 pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinového jádra. Tento typ reakce byl proveden nejprve konvenčně za atmosférického tlaku, kde byla sloučenina **3** získána přibližně po 24 hodinách. Snaha o zkrácení reakční doby vedla k vyzkoušení konvenční syntézy za atmosférického tlaku. Byla provedena série příprav sloučeniny **3** za různých podmínek s překvapujícím výsledkem, kdy v žádném z provedených experimentů nebyl v chromatogramu pozorován pík odpovídající požadovanému produktu či jiné nově vznikající organické sloučeniny, ale pouze píky odpovídající použitým reaktantům. Následně byla S<sub>N</sub>Ar atomu Cl provedena pomocí mikrovlnného reaktoru, přičemž došlo k optimalizaci následujících reakčních podmínek: druh rozpouštědla, maximální výkon mikrovlnného reaktoru, teplota a čas. Veškeré reakce byly prováděny s modelovým substituentem (anilin), kdy jako optimální se ukázaly být syntézy uskutečněné v ethanolu při maximálním výkonu mikrovlnného reaktoru 200 W, teplotě 120 °C, po dobu 15 minut. Za těchto podmínek došlo již po 15 minutách k úplnému zreagování výchozí sloučeniny za vzniku požadovaného produktu **3**, který byl po přečištění surové reakční směsi pomocí sloupcové chromatografie vyizolován ve velmi dobrém výtěžku 88 %. Následně bylo připraveno a strukturně plně charakterizováno celkem šest nových 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových sloučenin (**4–9**).

Závěrem lze konstatovat, že byla vyvinuta rychlá mikrovlnami asistovaná metoda pro přípravu 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových sloučenin. Připraveno bylo celkem šest 4,7-disubstituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinových sloučenin, jejichž

struktura nebyla dříve v literatuře popsána. V blízké budoucnosti bude potřeba vyvinout účinnější postup zpracování reakční směsi, kdy u dvou typů připravených sloučenin docházelo ke komplikacím (tvorba sraženiny). Všechny připravené sloučeniny budou rovněž podstoupeny testům jejich biologické aktivity, pravděpodobně ve spolupráci z kolegy z Univerzity Palackého v Olomouci.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vodrážka, Z. & Krechl, J. *Bioorganická chemie*. (Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1991).
2. Červinka, O., Dědek, V., Ferles, M. *Organická chemie*, druhé přepracované vydání. (Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1982).
3. Arcari, J. T. *et al.* Discovery and synthesis of novel 4-aminopyrrolopyrimidine Tie-2 kinase inhibitors for the treatment of solid tumors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 3059–3063 (2013).
4. Liu, Y. *et al.* Identification and synthesis of substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as novel firefly luciferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 5473–5482 (2012).
5. Sun, L. *et al.* Rational design of 4,5-disubstituted-5,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-ones as a novel class of inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and Her2(p185erbB) tyrosine kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2153–2157 (2002).
6. Sabat, N., Poštová Slavětínská, L., Klepetářová, B. & Hocek, M. C-H Phosphonation of Pyrrolopyrimidines: Synthesis of Substituted 7- and 9-Deazapurine-8-phosphonate Derivatives. *J. Org. Chem.*, 81, 9507–9514 (2016).
7. Gujral, S. S., Khatri, S., Riyal, P. & Gahlot, V. Suzuki Cross Coupling Reaction- A Review. *Indo Glob. J. Pharm. Sci.*, 2, 351–367 (2012).
8. Anthony, N. G. *et al.* Inhibitory Kappa B Kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) Inhibitors That Recapitulate Their Selectivity in Cells against Isoform-Related Biomarkers. *J. Med. Chem.*, 60, 7043–7066 (2017).
9. Klepper, F., Polborn, K. & Carell, T. Robust Synthesis and Crystal-Structure Analysis of 7-Cyano-7-deazaguanine (PreQ0 Base) and 7-(Aminomethyl)-7-deazaguanine (PreQ1 Base). *Helv. Chim. Acta*, 88, 2610–2616 (2005).
10. Hlaváč, J., Sural, M. & Krchňák, V. Practical Aspects of Combinatorial Solid-Phase Synthesis. in *Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications* 95–130 (2011). doi:10.1002/9781118141649.ch3
11. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide.

- J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149–2154 (1963).
12. Dörwald, F. *Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002).
  13. Hermkens, P. H. H., Ottenheijm, H. C. J. & Rees, D. Solid-phase organic reactions: A review of the recent literature. *Tetrahedron*, 52, 4527–4554 (1996).
  14. Lam, K. S., Lebl, M. & Krchňák, V. The ‘one-bead-one-compound’ combinatorial library method. *Chem. Rev.* 97, 411–448 (1997).
  15. Knepper, K., Gil, C. & Bräse, S. *Highlights in Bioorganic Chemistry: Methods and Applications*. (Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, 2004).
  16. James, I. W. Linkers for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron*, 55, 4855–4946 (1999).
  17. Krajčovičová, S. & Soral, M. Solid-Phase Synthetic Strategies for the Preparation of Purine Derivatives. *ACS Comb. Sci.*, 18, 371–386 (2016).
  18. Norman, T. C., Gray, N. S., Koh, J. T. & Schultz, P. G. A structure-based library approach to kinase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7430–7431 (1996).
  19. Gray, N. S., Kwon, S. & Schultz, P. G. Combinatorial synthesis of 2,9-substituted purines. *Tetrahedron Lett.*, 38, 1161–1164 (1997).
  20. Brun, V., Legraverend, M. & Grierson, D. S. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: Development of a general strategy for the construction of 2,6,9-trisubstituted purine libraries. Part 2. *Tetrahedron Lett.*, 42, 8165–8167 (2001).
  21. Brun, V., Legraverend, M. & Grierson, D. S. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: Development of a general strategy for the construction of 2,6,9-trisubstituted purine libraries. Part 1. *Tetrahedron Lett.*, 42, 8161–8164 (2001).
  22. Lee, J. H. & Lim, H.-S. Solid-phase synthesis of tetrasubstituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *Org. Biomol. Chem.*, 10, 4229 (2012).
  23. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B. & Westman, J. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron*, 57, 9225–9283 (2001).
  24. Austin, R. E., Okonya, J. F., Bond, D. R. S. & Al-Obeidi, F. Microwave-assisted solid-phase synthesis (MASS) of 2,6,9-trisubstituted purines. *Tetrahedron Lett.*, 43,

- 6169–6171 (2002).
25. Qu, G. R. *et al.* Microwave promoted palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions of 6-chloropurines with sodium tetraarylborate in water. *Tetrahedron*, 67, 9099–9103 (2011).
  26. Lanver, A. & Schmalz, H. G. Microwave-assisted amination of a chloropurine derivative in the synthesis of acyclic nucleoside analogues. *Molecules*, 10, 508–515 (2005).
  27. Qu, G., Han, S., Zhang, Z., Geng, M. & Xue, F. Microwave assisted synthesis of 6-substituted aminopurine analogs in water. *J. Braz. Chem. Soc.*, 17, 915–922 (2006).
  28. Čechová, L. *et al.* The optimized microwave-assisted decomposition of formamides and its synthetic utility in the amination reactions of purines. *Tetrahedron*, 67, 866–871 (2011).
  29. Todorovic, N., Awuah, E., Shakya, T., Wright, G. D. & Capretta, A. Microwave-assisted synthesis of N1- and C3-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidine libraries. *Tetrahedron Lett.*, 52, 5761–5763 (2011).
  30. He, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine derivatives as selective Btk inhibitors with improved pharmacokinetic properties for the treatment of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Med. Chem.*, 145, 96–112 (2018).
  31. Wang, Y. *et al.* Discovery of 4-((7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)phenyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide (FN-1501), as a FLT3/CDKs kinase inhibitor with potential high efficiency against acute myelocytic leukemia (AML). *J. Med. Chem.*, 61, 4, 1499-1518
  32. [Online, 24. 3. 2018] <https://www.fosunpharma.com/en/news/news-details-3>
  33. Thorarensen, A. *et al.* Design of a Janus Kinase 3 (JAK3) Specific Inhibitor 1-((2S,5R)-5-((7H-Pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)-2-methylpiperidin-1-yl)prop-2-en-1-one (PF-06651600) Allowing for the Interrogation of JAK3 Signaling in Humans. *J. Med. Chem.*, 60, 1971–1993 (2017).
  34. Wang, T. *et al.* Design, synthesis and evaluation of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-phenylamide hybrids as potent Janus kinase 2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,

- 26, 2936–2941 (2016).
35. Xing, R. *et al.* Novel 6-substituted benzoyl and non-benzoyl straight chain pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as potential antitumor agents with multitargeted inhibition of TS, GARFTase and AICARFTase. *Eur. J. Med. Chem.*, 139, 531–541 (2017).
  36. Wood, G. S. & Wu, J. Methotrexate and Pralatrexate. *Dermatol. Clin.*, 33, 747–755 (2015).
  37. Chattopadhyay, S., Moran, R. G. & Goldman, I. D. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol. Cancer Ther.*, 6, 404–417 (2007).
  38. Musumeci, F. *et al.* Identification of new pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as Src tyrosine kinase inhibitors in vitro active against Glioblastoma. *Eur. J. Med. Chem.*, 127, 369–378 (2017).
  39. Gergela D. *Příprava 6,9-disubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem.* 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav chemie.
  40. Zatloukal F. *Syntéza pyrrolo [2,3- d] pyrimidinů s adamantanovým skeletem.* 2017. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav chemie.
  41. Velecký, R. *Syntéza 4,7-disubstituovaných pyrrolo [2,3-d] pyrimidinů.* 2018. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav chemie.



**SEZNAM ZKRATEK**

Ac <sub>2</sub> O	anhydrid kyseliny octové
AMEBA	methoxybenzaldehyd citlivý na kyselé prostředí
AML	akutní myeloidní leukémie
Btk	Brutonova tyrosinkináza
CDK	cyklin-dependentní kináza
CID	kolizní indukovaná disociace
DEAD	diethylazodikarboxylát
DIEA	diethylamin
DMA	dmethylacetamid
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
GBM	multiformní glioblastom
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
IR	infračervená spektroskopie
JAK 1-3	janus kinázy typu 1-3
mCPBA	kyselina <i>m</i> -chlorperoxybenzoová
MTX	methotrexát
MW	mikrovlny
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidin
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	[1,1'-bis(difenylfosfin)ferrocen]dichlorpalladium

---

PivCl	pivaoylchlorid
PMX	pralatrexát
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
PPh <sub>3</sub>	trifenylfosfin
PyBroP	bromotripyrrolidino-fosfoniumhexafluorofosfát
RVO	rotační vakuová odparka
S <sub>N</sub> Ar	nukleofilní aromatická substituce
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TK	tyrosin kináza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMSI	trimethylsilyljodid
TPA	12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát
TPPTS	trifenylfosfin trisulfonát sodný

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Struktura a číslování purinu a 7-deazapurinu. ....	11
<b>Obrázek 2:</b> Příklad alkylace pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu. ....	12
<b>Obrázek 3:</b> Příklad alkylace a následné S <sub>N</sub> Ar derivátu pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu I. ....	13
<b>Obrázek 4:</b> Příklad alkylace a následné S <sub>N</sub> Ar derivátu pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu II. ....	13
<b>Obrázek 5:</b> Příklad S <sub>N</sub> Ar atomu Cl derivátu pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu I. ....	14
<b>Obrázek 6:</b> Příklad S <sub>N</sub> Ar atomu Cl derivátu pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu II. ....	15
<b>Obrázek 7:</b> Základní postup syntézy peptidů podle Merrifielda. ....	16
<b>Obrázek 8:</b> Princip syntézy na pevné fázi. ....	16
<b>Obrázek 9:</b> První syntéza derivátu purinu na pevné fázi. ....	18
<b>Obrázek 10:</b> Příklad syntézy 2,6,9-trisubstituovaných purinů na pevné fázi. ....	19
<b>Obrázek 11:</b> Příklad syntézy 2,6,9-trisubstituovaných purinů na pevné fázi. ....	20
<b>Obrázek 12:</b> Příklad syntézy 2,4,6,7-tetrasubstituovaných pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinů na pevné fázi. ....	20
<b>Obrázek 13:</b> Využití mikrovlnami asistované syntézy v oblasti organické chemie. ....	21
<b>Obrázek 14:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu na pevné fázi. ....	22
<b>Obrázek 15:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku I. ....	22
<b>Obrázek 16:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku II. ....	23
<b>Obrázek 17:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku III. ....	23
<b>Obrázek 18:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy derivátu purinu v roztoku IV. ....	24
<b>Obrázek 19:</b> Příklad mikrovlnami asistované syntézy pyrazolo[3,4- <i>d</i> ]pyrimidinu v roztoku. ....	25
<b>Obrázek 20:</b> Struktura nového Btk inhibitoru spolu s inhibičními koncentracemi. ....	27
<b>Obrázek 21:</b> Struktura nového FLT3 a CDK inhibitoru FN-1501(vlevo) a struktura AT7519 (vpravo). ....	27
<b>Obrázek 22:</b> Struktura nového JAK3 inhibitoru, hodnoty IC <sub>50</sub> proti jednotlivým skupinám JAK. ....	28
<b>Obrázek 23:</b> Struktura nového JAK2 inhibitoru. ....	28
<b>Obrázek 24:</b> Struktura nového KB inhibitoru a srovnání jeho inhibiční aktivity se strukturně podobnými inhibitory. ....	29
<b>Obrázek 25:</b> Struktura nových inhibitorů Src tyrosin kinázy aktivních proti Glioblastomu. ....	30

<b>Obrázek 26:</b> Alkylace 4-chlor-7 <i>H</i> -pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu.....	42
<b>Obrázek 27:</b> Aromatické aminy použité na S <sub>N</sub> Ar atomu Cl.....	44
<b>Obrázek 28:</b> S <sub>N</sub> Ar atomu Cl konvenčně za atmosférického tlaku.....	45
<b>Obrázek 29:</b> Výsledek ESI-MS/MS analýzy sloučeniny 3. ....	46
<b>Obrázek 30:</b> : S <sub>N</sub> Ar atomu Cl konvenčně za zvýšeného tlaku.....	48
<b>Obrázek 31:</b> Mikrovlnami asistovaná S <sub>N</sub> Ar atomu Cl za použití/vyloučení báze.....	49
<b>Obrázek 32:</b> Výsledky GC-FID analýzy reakčních směsí získaných MW syntézou (EtOH, 200 W, 120 °C) po 10, 20, 30 a 40 minutách (černá - 10 min, růžová - 20 min, modrá - 30 min, hnědá - 40 min).....	51
<b>Obrázek 33:</b> Výsledky GC-FID analýzy reakčních směsí získaných MW syntézou (EtOH, 200 W, 140 °C) po 10 a 40 minutách (černá - 10 min, růžová - 40 min).....	53
<b>Obrázek 34:</b> Výsledek GC-FID analýzy reakční směs získané MW syntézou (EtOH, 200 W, 150 °C, 15 minut). ....	53
<b>Obrázek 35:</b> Mikrovlnami asistovaná syntéza nových derivátů pyrrolo[2,3- <i>d</i> ]pyrimidinu.....	54
<b>Obrázek 36:</b> GC-MS analýza sloučeniny 8. A) část chromatogramu surové reakční směsi, B) část chromatogramu po čištění sloupcovou chromatografií, C) EI-MS spektrum. ....	56
<b>Obrázek 37:</b> ESI-MS/MS spektra sloučeniny 8. A) ESI-MS, B) ESI-MS/MS iontu [M+H] <sup>+</sup> .....	57
<b>Obrázek 38:</b> <sup>1</sup> H NMR spektrum sloučeniny 8. ....	58

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka 1:</b> Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy I.....	50
<b>Tabulka 2:</b> Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy II. ....	51
<b>Tabulka 3:</b> Optimalizace mikrovlnami asistované syntézy III. ....	52

## SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1:** Reakční zkumavka pro konvenční syntézu za zvýšeného tlaku

**Příloha 2:** Mikrovlnný reaktor Discovery SP

**Příloha 3:**  $^1\text{H}$  NMR 4-chlor-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (2)

**Příloha 4:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-fenyl-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (3)

**Příloha 5:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-fluorfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (4)

**Příloha 6:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-bromfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (5)

**Příloha 7:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-methylfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (6)

**Příloha 8:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-metoxyfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (7)

**Příloha 9:**  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-chlorfenyl)-7-isopropyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (9)

**PŘÍLOHA 1: REAKČNÍ ZKUMAVKA PRO KONVENČNÍ SYNTÉZU  
ZA ZVÝŠENÉHO TLAKU**

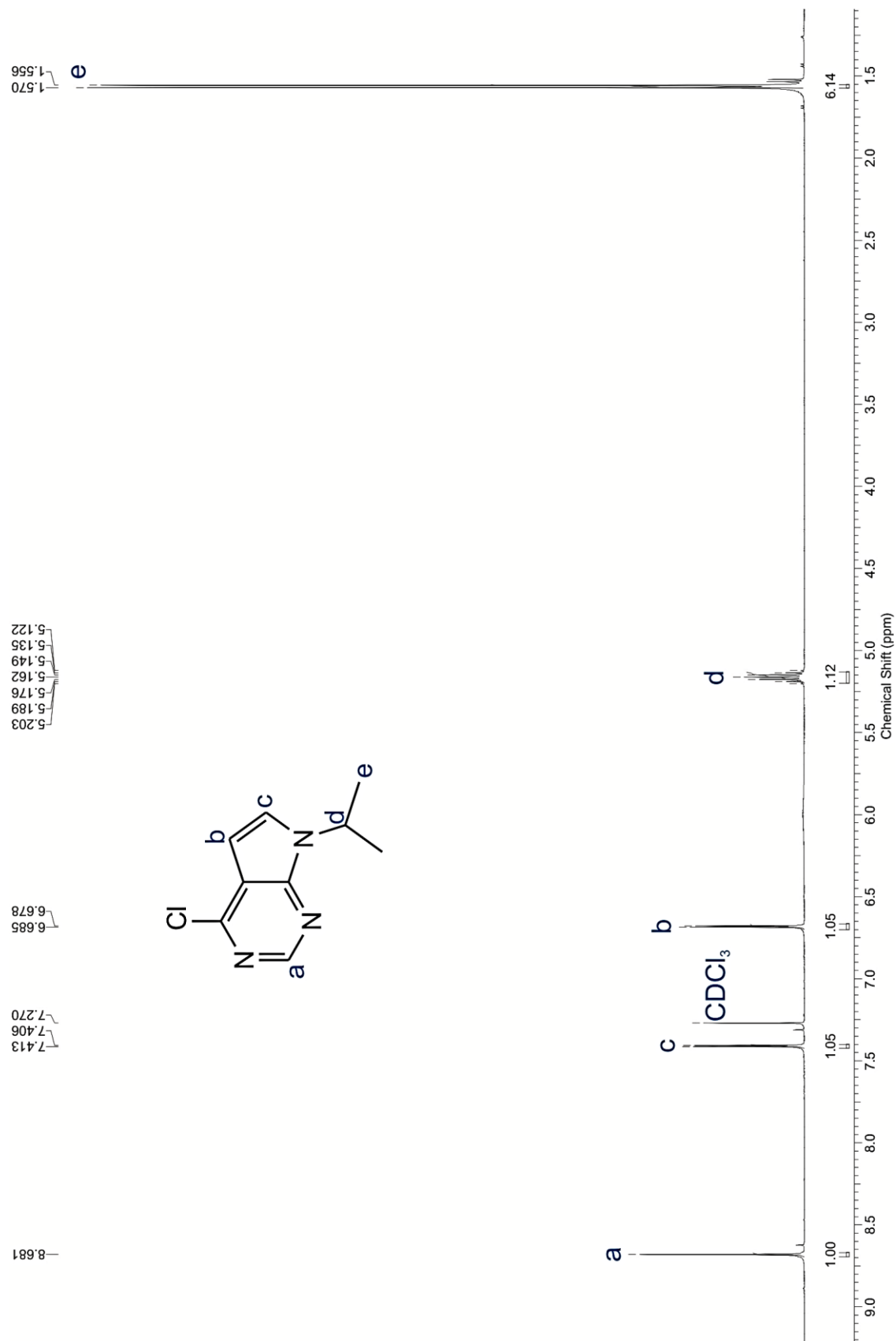


## PŘÍLOHA 2: MIKROVLNNÝ REAKTOR DISCOVERY SP

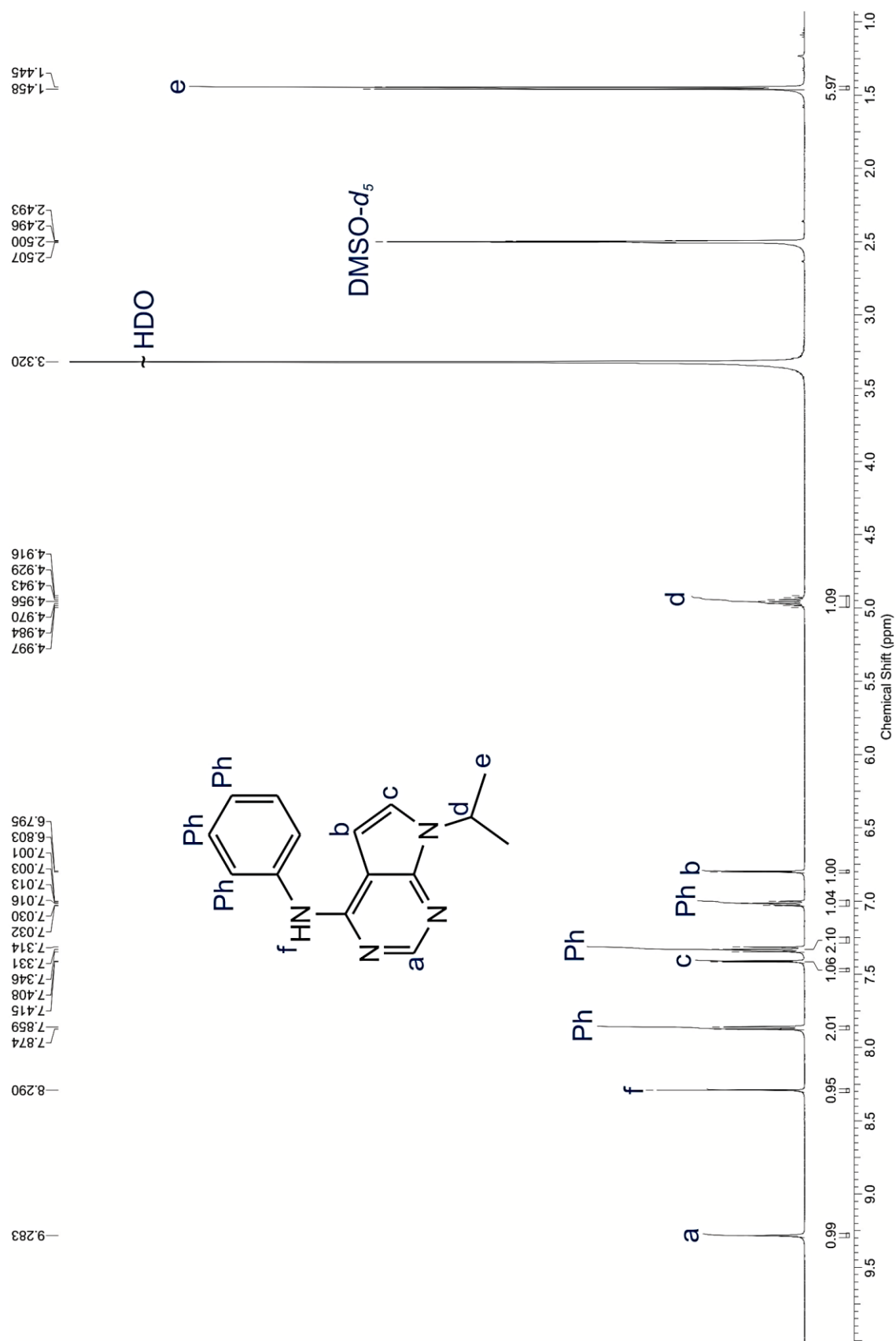




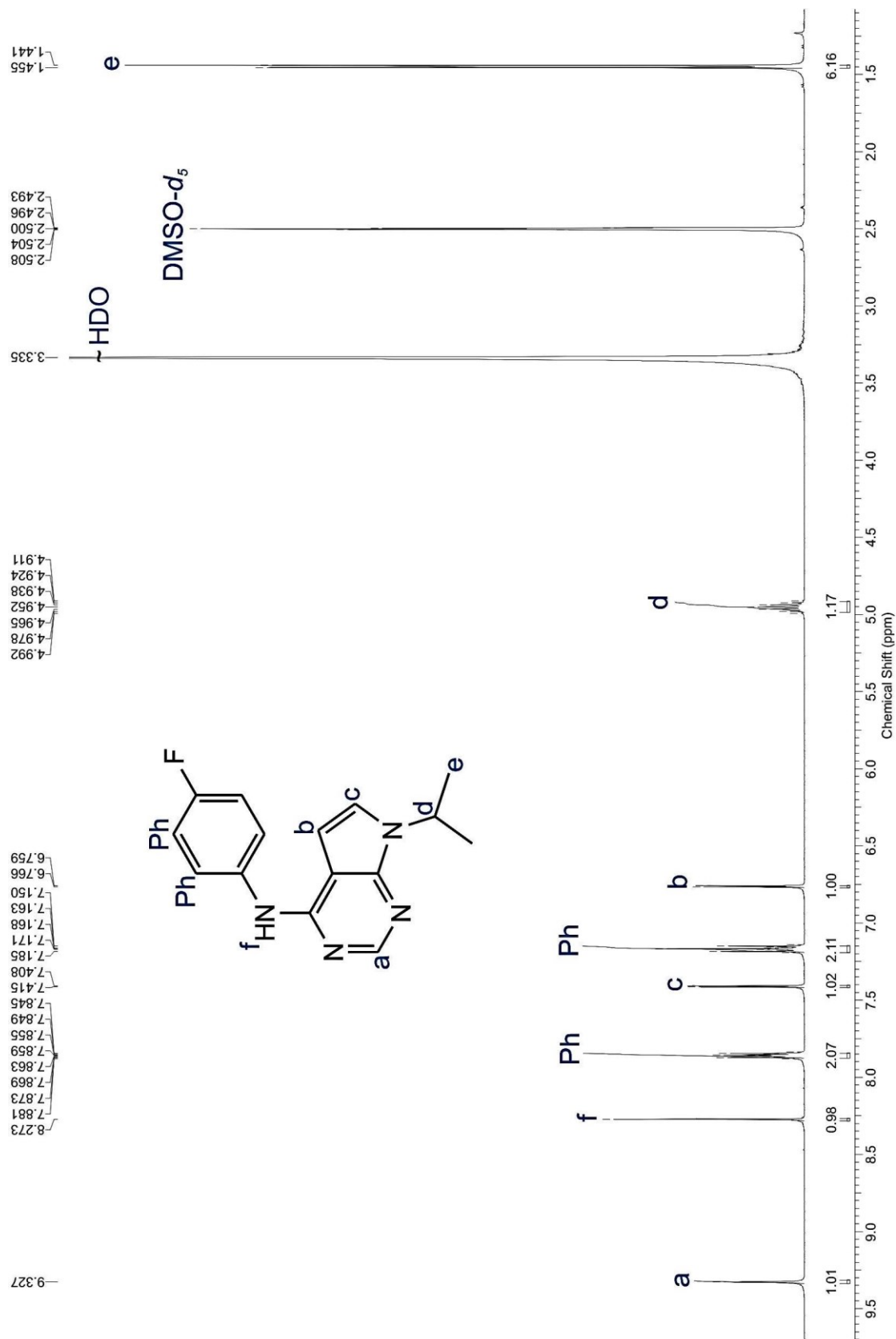
# PŘÍLOHA 3: <sup>1</sup>H NMR 4-CHLOR-7-ISOPROPYL-7H-PYRROLO[2,3-D]PYRIMIDINU (2)



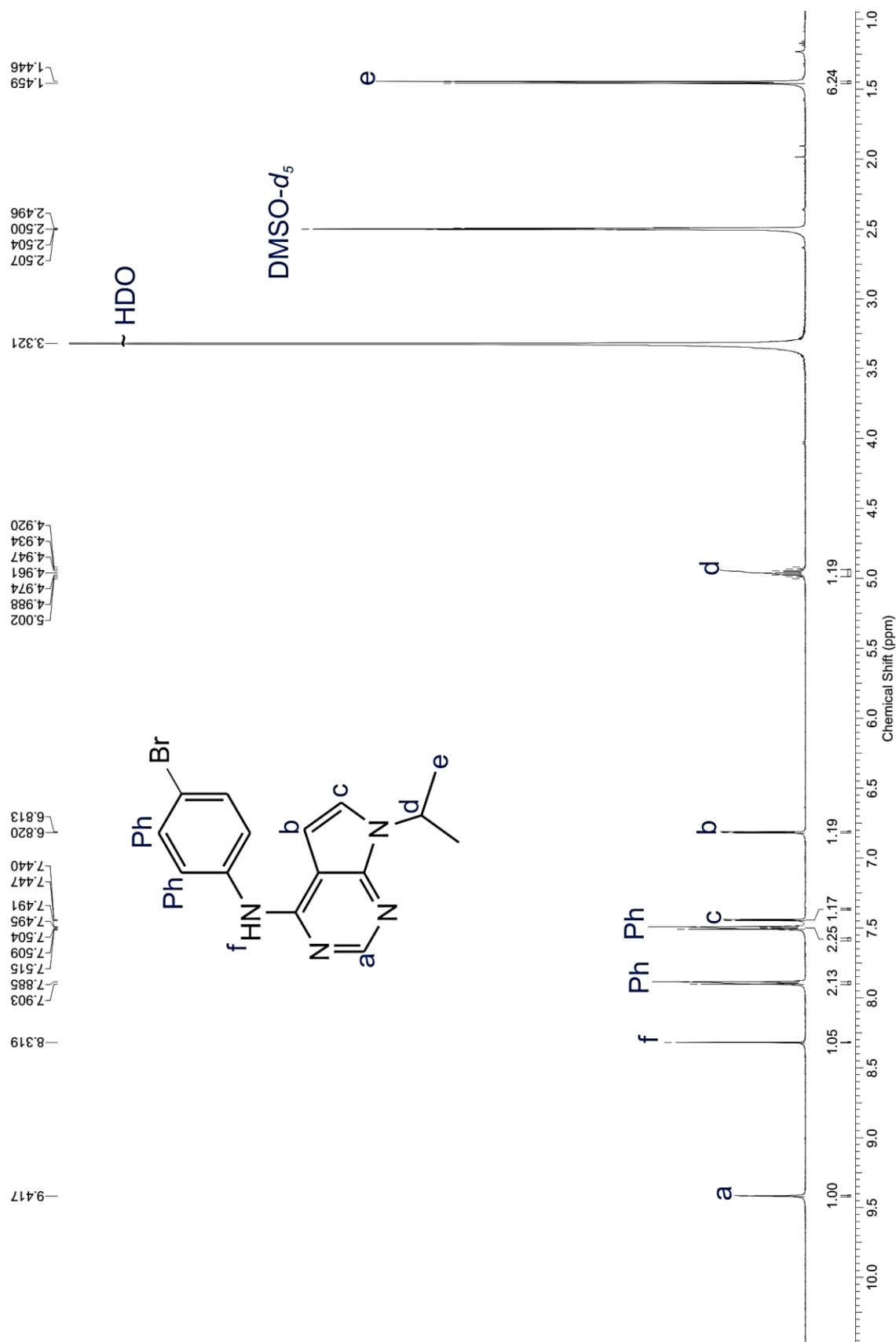
**PŘÍLOHA 4:  $^1\text{H}$  NMR *N*-FENYL-7-ISOPROPYL-7*H*-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDIN-4-AMINU (3)**



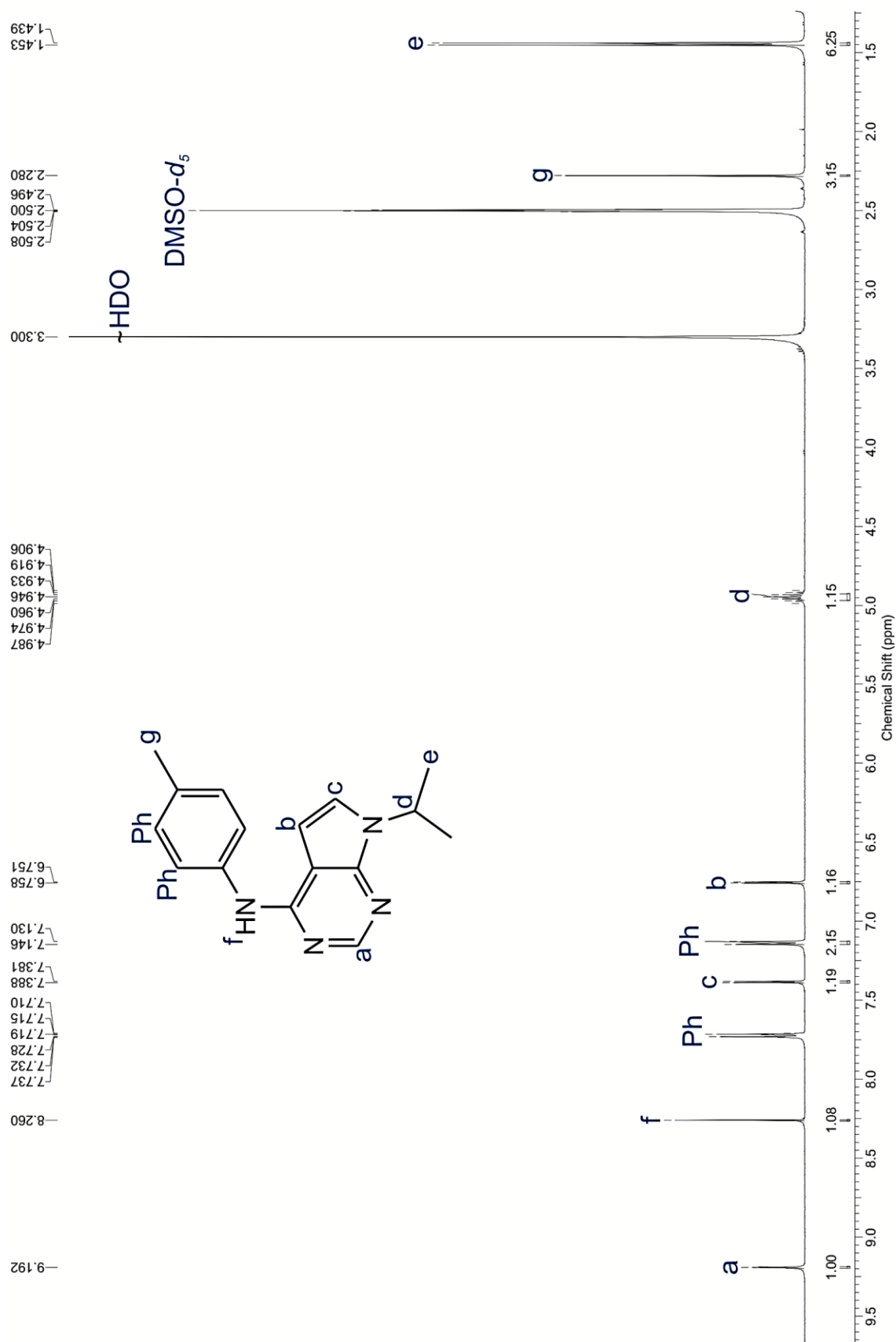
**PŘÍLOHA 5:  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-FLUORFENYL)-7-ISOPROPYL-7*H*-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDINU (4)**



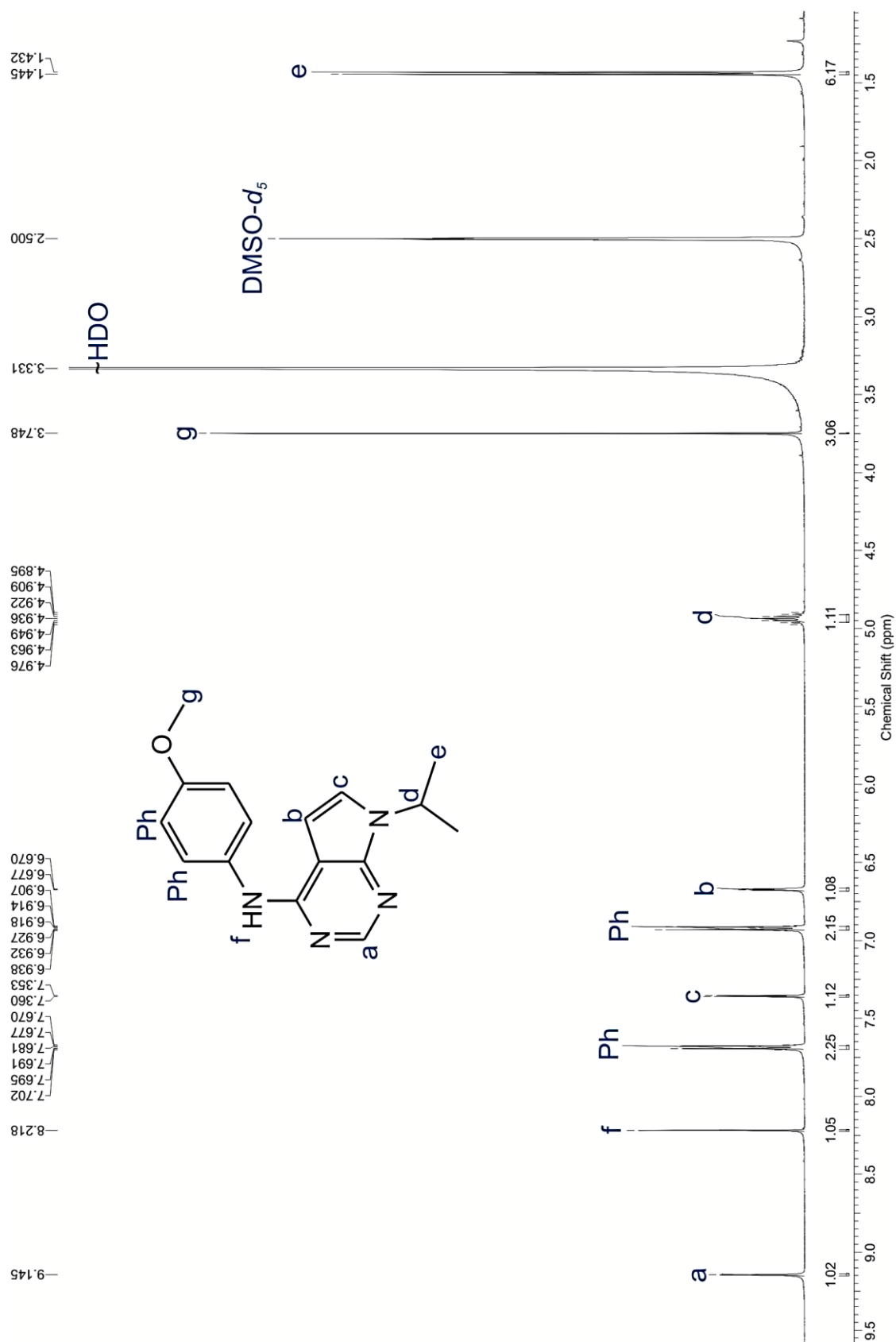
**PŘÍLOHA 6:  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-BROMFENYL)-7-ISOPROPYL-7*H*-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDIN-4-AMINU (5)**



# PŘÍLOHA 7: $^1\text{H}$ NMR *N*-(4-METYLFENYL)-7-ISOPROPYL-7*H*-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDIN-4-AMINU (6)



# PŘÍLOHA 8: $^1\text{H}$ NMR *N*-(4-METOXYFENYL)-7*H*-ISOPROPYL-7*H*-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDIN-4-AMINU (7)



**PŘÍLOHA 9:  $^1\text{H}$  NMR *N*-(4-CHLORFENYL)-7-ISOPROPYL-7H-PYRROLO[2,3-*D*]PYRIMIDIN-4-AMINU (9)**

