

Syntéza a studium biologických účinků purinových nukleosidů substituovaných 1-adamantylem

Ing. Jana Rudolfová, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze disertační práce

Syntéza a studium biologických účinků purinových nukleosidů substituovaných 1-adamantylem

Synthesis and Study of Biological Activity of Purine Nucleosides Substituted with 1-Adamantyl

Autor: **Ing. Jana Rudolfová, Ph.D.**

Studijní program: **P2901 / Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **2901V013 / Technologie potravin**

Školitel: doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.

Konzultant: Ing. Michal Rouchal, Ph.D.

Oponenti: prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.
doc. Ing. Stanislav Kafka, CSc.
doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.

Zlín, září 2022

© Jana Rudolfová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2022.

Klíčová slova: glykosylace, nukleosid, purin, nukleofilní aromtická substituce, biologická aktivita

Key words: glycosylation, nucleoside, purine, nucleophilic aromatic substitution, biological activity

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-102-3

Abstrakt

Purinové nukleosidy představují jednu z nejrozšířenějších skupin dusíkatých heterocyklů zastoupených v přírodě. V medicíně jsou velmi často používány zejména pro své významné biologické účinky, jakými je inhibice transportu nukleosidů v organismech, antifungální, antivirotická či protinádorová aktivita.

Předložená práce se zabývá přípravou série nových purinových 2,6-disubstituovaných ribonukleosidů nesoucích unikátní adamantylované aminy. Sestavená multikroková syntéza zahrnuje sekvenci několika po sobě jdoucích reakcí, a sice glykosylaci vybraných, případně připravených, purinových derivátů v poloze N9, nukleofilní aromatickou substituci do polohy C6 na purinovém skeletu vzniklých nukleosidů a následné odchránění nukleosidů. V případě, že molekula daných látek dovozovala, byly provedeny ještě doplňující modifikace v podobě redukce či další nukleofilní aromatické substituce do polohy C2 purinového jádra. Všechny připravené látky byly získány ve velmi dobrých výtěžcích a v odpovídající čistotě. Rovněž byla jejich struktura potvrzena pomocí běžně používaných metod spektrální analýzy.

Právě z důvodů zjištění možného medicínského využití byly připravené sloučeniny podrobeny testům na biologickou aktivitu (antiproliferační účinky a inhibici enzymu), v jejichž rámci byly provedeny také komplexace testovaných nukleosidů s β -cyklodextrinem.

Abstract

Purine ribonucleosides represent one of the most extensive groups of nitrogen heterocycles in the nature. In the medicine, these compounds are very often used mainly for a wide range of interesting biological effects, such as inhibition of nucleoside transport in the organisms or antifungal, antiviral and antitumor activities.

Submitted work deals with a preparation of series of novel purine 2,6-disubstituted ribonucleosides bearing unique adamantylated amines. Assembled multi-step synthesis contains a sequence of several one by one reactions, namely a glycosylation of selected, or prepared purine derivatives at the position N9 with a protected ribose as a glycosyl donor, a nucleophilic aromatic substitution in the position 6 of formed nucleosides' purine ring, followed by a deprotection of ribofuranose units at nucleosides. If the molecule of prepared compounds enabled, they were modified in next reactions as a reduction or a nucleophilic aromatic substitution in the position C2 of the purine core. All prepared compounds were obtained in good yields and purity. Their structures were confirmed using common methods of spectral analysis.

For possibility of medical use, final nucleosides were subjected to tests for biological activity (antiproliferative effects and enzyme inhibition) including complexation of tested nucleosides with β -cyclodextrin.

OBSAH

ÚVOD.....	6
TEORETICKÁ ČÁST	7
1 GLYKOSYLACE	7
2 SYNTÉZA NUKLEOSIDŮ	9
2.1 Glykosylace a deproteckce.....	9
2.2 Nukleofilní substituce do poloh C6 a C2 purinových derivátů a nukleosidů	12
3 PURINOVÉ NUKLEOSIDY A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA.....	15
3.1 Cytostatika	15
3.2 Antivirotika	16
3.3 Agonisté adenosinového receptoru	17
3.4 Antibiotika	18
3.5 Cytokininové ribosidy	18
4 ADAMANTAN V PURINOVÝCH NUKLEOSIDECH	20
5 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	22
DISKUZE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKY	23
6 MULTIKROKOVÁ SYNTÉZA PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ.....	23
6.1 Příprava adamantylových substituentů a dalších výchozích látek	24
6.2 Příprava purinových derivátů a jejich glykosylace.....	26
6.2.1 Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze C6.....	27
6.2.2 Redukce karbonylové skupiny u purinových derivátů s atomem vodíku v poloze C2.....	28
6.2.3 Glykosylace	29
6.3 Odchránění prekurzorů nukleosidů.....	36
6.4 Redukce karbonylové skupiny sloučenin 25 , 26 , 28 a 29	37
6.5 Nukleofilní aromatická substituce atomu Cl v poloze C2	38
7 STUDIUM TVORBY HOSTITEL–HOST KOMPLEXŮ S β -CD	41
8 STUDIUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY PURINOVÝCH NUKLEOSIDŮ ...	46
8.1 Cytotoxicita.....	46
8.2 Inhibice enzymu CKX.....	48
ZÁVĚR.....	59
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
SEZNAM OBRÁZKŮ	58
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
CURRICULUM VITAE	61

ÚVOD

Puriny a monosacharidy svým významným zastoupením v přírodě, zajímavými vlastnostmi a důležitými funkcemi v metabolických drahách neustále přitahují pozornost nespočtu výzkumných týmů s různorodým zaměřením. Tyto dvě skupiny sloučenin se velmi úzce setkávají zejména v oblasti cukerné chemie a chemie nukleových kyselin v podobě nukleosidových bází. Vznikají prostřednictvím glykosylačních reakcí, jejichž charakteristikou se zabývá většina teoretické části této práce. Přestože jsou glykosylace prováděny již více než celé století, jejich komplikovanost je téměř pověstná. „*Na první pohled se nezdají být příliš složité – glykosylový donor reaguje s glykosylovým akceptorem za přítomnosti aktivátoru. Přesto každý, kdo má zkušenosti v oblasti chemie cukrů, ví, že každá glykosylace je unikátní reakcí, která musí být optimalizována individuálně a stále často první pokus nejednoho vědce končí stopou na TLC vrstvě připomínající čárový kód.*“¹

Do skupiny nejběžnějších dusíkatých sloučenin v živých organismech se řadí i deriváty adeninu a jeho glykosylované formy, adenosinu. Z toho důvodu volně navazuje na pojednání o glykosylacích kapitola zabývající se jedněmi z nejčastějších modifikací purinů, a to nukleofilními aromatickými substitucemi, které jsou vedené zejména do poloh 2 a 6 základního purinového kruhu.

Ovšem nejen vznikem a proměnami je příroda živa. Spousta látek na bázi purinu či jeho příbuzných heterocyklických analogů vykazují i jistou biologickou aktivitu. Na straně jedné stojí léčiva, jichž je v klinické praxi už několik let hojně využíváno, nebo jsou v současnosti na klinické úrovni testovány. Na straně druhé, se jedná o významné bioaktivní sloučeniny izolované z přírodních zdrojů, o jejichž možném využití ve farmacii se teprve uvažuje. Velmi podobné je tomu i v případě klecového uhlovodíku adamantanu, jehož využití a důležitost pro farmakologii a lékařství je přiblíženo v závěru teoretické části.

Stejně jako se staví dům, popisuje experimentální část práce krok po kroku, kámen po kameni sestavení syntézy vedoucí k vytyčeným ribonukleosidům, do nichž byly účelně zakomponovány unikátní adamantylované primární aminy, v minulosti navržené a vytvořeny naší výzkumnou skupinou. Nukleofilní aromatickou substitucí se podařilo těmito primárními aminy obsadit polohu C6 vybraných purinových derivátů a získané poznatky o glykosylacích byly přetransformovány v nezdary a ty následně ve zdárné vytvoření ribosylovaných purinů v poloze N9. Finální ribonukleosidy byly dokončeny odstraněním chránících skupin z glykosylového zbytku. Pokud to struktury připravených nukleosidů dovolovaly, byly u nich provedeny ještě další modifikace purinového kruhu.

Vrcholem celé práce je studium biologické aktivity oněch získaných sloučenin, zda mají předpoklady dostat se mezi úspěšné adepty pro lékařské využití. V rámci biologických testů byly zkoumány i komplexy připravených nukleosidů s β -cyklodextrinem.

TEORETICKÁ ČÁST

1 GLYKOSYLACE

Glykosylace je významná modifikace biologicky aktivních látek, proto patří mezi nejdůležitější reakce v oblasti cukerné chemie a glykobiologie. Umožňuje konverzi lipofilních látek na hydrofilní, čímž významně ovlivňuje nejen jejich fyzikálně-chemické (rozpuštěnost ve vodných médiích) či farmakokinetické (transport přes buněčné membrány, biologická dostupnost) vlastnosti, ale i farmakodynamické účinky. Současně však jde i o jeden z nejméně interpretovaných mechanismů organické syntézy.²⁻⁴

V průběhu glykosylačních reakcí dochází ke spojení dvou monosacharidů nebo k zavedení jedné či více monomerních sacharidových jednotek do struktury různých molekul necukerné povahy, kterými mohou být lipidy, aminokyseliny, bílkoviny, alkaloidy, peptidy nebo steroidy, za vzniku glykosidové vazby.^{5,6} Tímto způsobem jsou získávány cukerné deriváty zvané glykosidy.

Při tvorbě glykosidové vazby dochází také ke zformování nového anomerního centra na atomu uhlíku C1 monosacharidového zbytku. Vznik a konečná konformace glykosidů závisí mimo jiné na konformaci, sterickém bránění a elektronovém zastoupení u obou reakčních partnerů.² Uplatňuje se zde anomerní efekt, na jehož základě je možné rozeznat dva stereoisomery, α -anomer (1,2-*cis*) a β -anomer (1,2-*trans*). Vzájemně se liší konfigurací hemiacetalové (anomerní) hydroxylové skupiny, která je u α -anomeru orientována pod rovinu kruhu monosacharidu, zatímco u β -anomeru nad ni, jak je ukázáno na Obrázku 1.^{7,8}



Obrázek 1: Obecné znázornění stereoisomerie glykosidů.

Protože detailní mechanismus glykosylací nebyl dlouho objasněn, sloužil model znázorněný na Schématu 1 jako obecné paradigma.⁷ V průběhu několika posledních let byl tento „návrh“ glykosylačních pochodů, jimiž se vznik glykosidů může ubírat, opakovaně experimentálně testován a ověřován.^{1-3,9-11}

Obecně by se dalo říci, že glykosylace nejčastěji probíhá mechanismem S_N1 zahrnující nukleofilní přesun na anomerním centru donoru po aktivaci odstupující skupiny, která se obvykle provádí interakcí s aktivátorem (či promotorem), méně často s katalyzátorem.^{6,7,12}

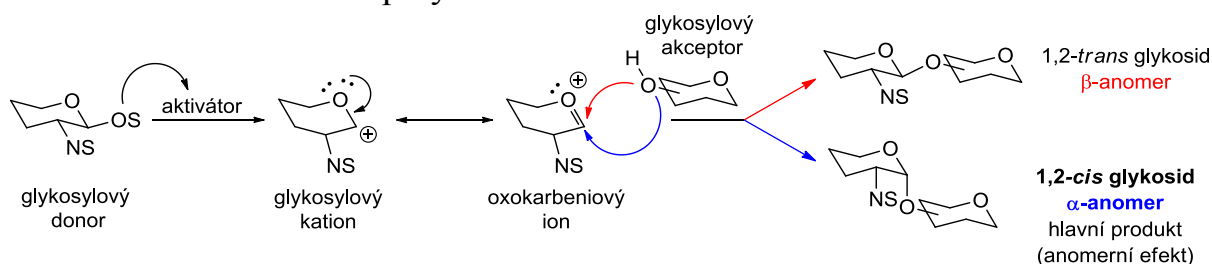
Pokud aktivátor zajišťuje oddělení anomerní odstupující skupiny z glykosylového donoru nesoucího neúčastníci se skupinu (benzylovou (Bn) pro neutrální cukry a azidovou (N_3) pro 2-amino-2-deoxycukry), vzniká glykosylový kation, kdy jediná možnost, jak jej intramolekulárně stabilizovat, je vytvoření oxokarbeniového iontu

(anomerní atom uhlíku je v hybridizaci sp^2). Nukleofilní atak pak může nastat téměř se stejnou pravděpodobností jak ze „spodní“ (α -), tak z „horní“ (β -) strany kruhu (Schéma 1a).

β -Glykosidová vazba však může být vytvořena také stereoselektivně, a to za aktivní spoluúčasti sousedících karbonylových skupin na atomu uhlíku C2 (Schéma 1b). Všeobecně jde například o substituenty jako *O*-acetylové (Ac), *O*-benzoylové (Bz), 2-ftalimidové (NPhth) a další. Takové glykosylace probíhají primárně přes bicyklický intermediát, acyloxoniový ion, jenž je opět výsledkem intramolekulární stabilizace glykosylového kationtu. V tomto případě je přiblížení nukleofilu (alkoholu či aglykonu) možné jen z „horní“ strany kruhu.^{6,7,13}

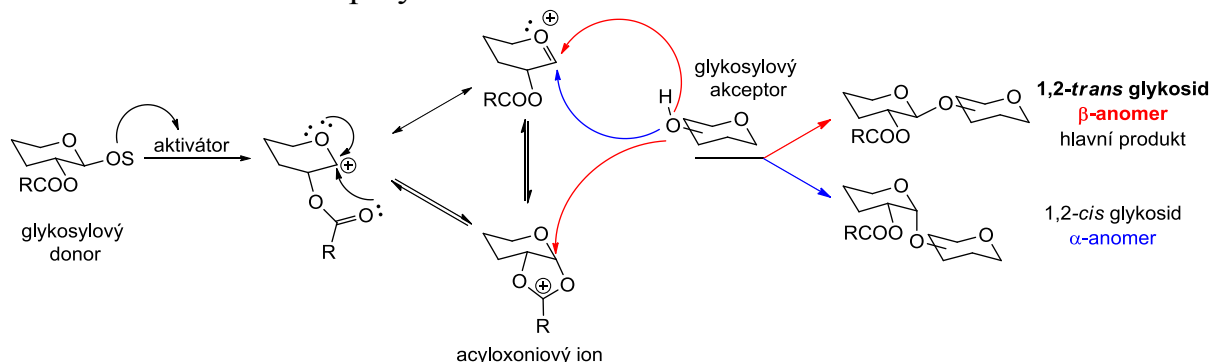
Schéma 1

a) za neúčasti sousedící skupiny



OS = odstupující skupina, NS = neúčastnící se skupina

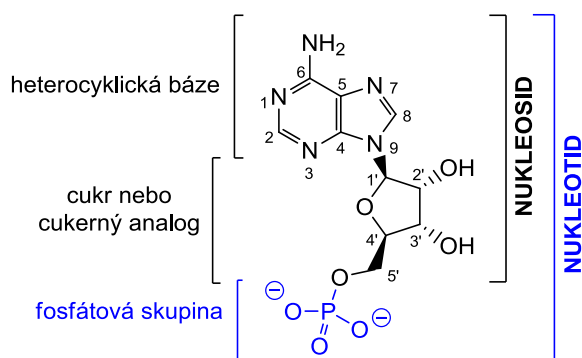
b) za účasti sousedící skupiny



OS = odstupující skupina

2 SYNTÉZA NUKLEOSIDŮ

Nejvýznamnějšími dusíkatými glykosidy jsou tzv. nukleové báze, z nichž se skládá páteř nukleových kyselin. Typický základ aglykonové složky nukleosidů a nukleotidů tvoří pyrimidin nebo purin, na který je *N*-glykosidovou vazbou napojena cukerná část, běžně zastoupena D-ribosou nebo 2-deoxy-D-ribosou (Obrázek 2).^{14,15} Je ovšem možné setkat se i s jiným monosacharidem, jako β -D-arabinosou či 3-deoxy- β -D-ribosou.¹⁶



Obrázek 2: Struktura adenosinu (nukleosid) a adenosinmonofosfátu (nukleotid).¹⁵

Skutečnost, že se nukleosidy skládají z těchto vcelku snadno definovatelných složek, jejich syntézu do jisté míry zjednodušuje. Všeobecná strategie zahrnuje tři základní stupně. Prvním je předpříprava jednotlivých komponentů ve vhodné ochráněné podobě, na což navazuje jejich vzájemné spárování s dosažením požadované stereochemie (glykosylace). Neodmyslitelnou součástí každé chemické syntézy nukleosidů je pak deprotektce, neboli odstranění chránících skupin.¹⁷ Tyto „základní kroky“ bývají doplněny o další reakce a přeměny ve snaze o přípravu nových sloučenin s doposud nepopsanou strukturou.

2.1 Glykosylace a deprotektce

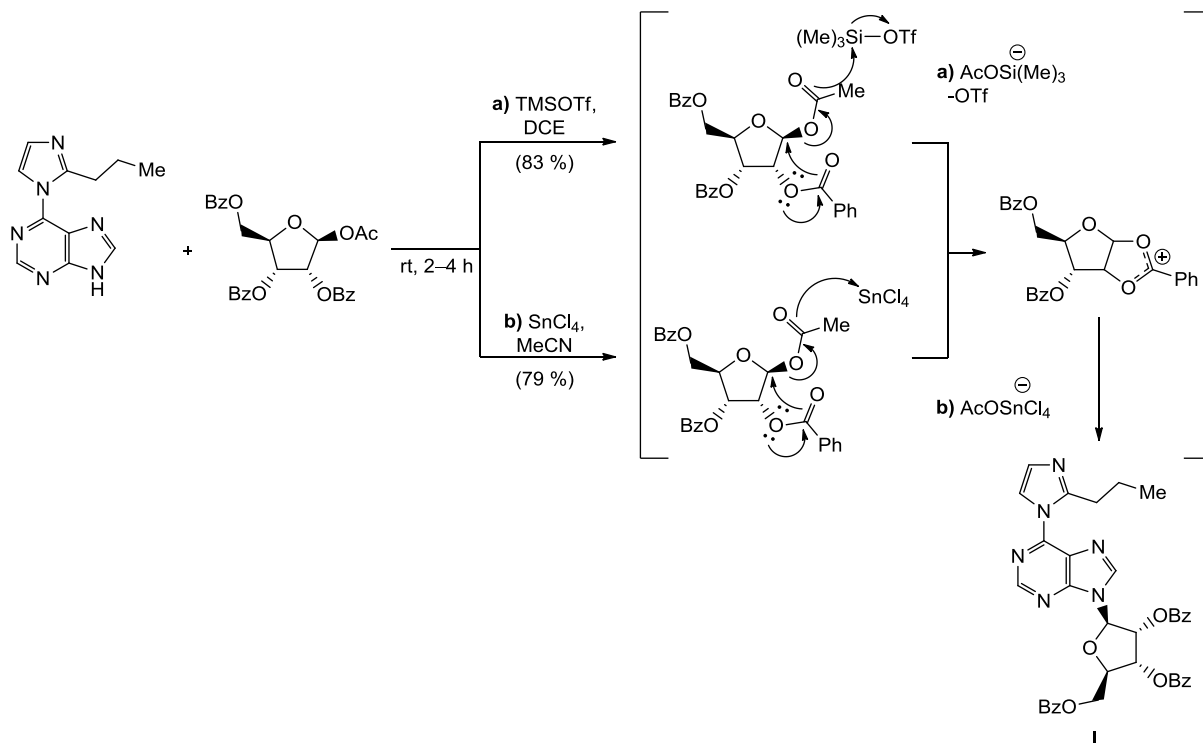
V současné době jsou nejpoužívanějšími aktivátory glykosylačních reakcí Lewisovy kyseliny, jako je chlorid cíničitý, titaničitý, zinečnatý nebo hlinitý, trimethylsilylchlorid (TMSCl), trimethylsilyltrifluormethansulfonát (TMSOTf, rovněž trimethylsilyltriflát), či etherát fluoridu boritého ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$).^{18–21} Takto modifikované Hilbertovy–Johnsonovy reakce* jsou relativně rychlé (cca 2–4 h), probíhají za mírných podmínek (laboratorní teplota) a majoritním produktem je preferovanější β -nukleosid, jehož izolace obnáší jen několik nepříliš složitých operací.¹⁸

Příklad Hilbertovy–Johnsonovy glykosylace je rozkreslen na Schématu 2, jehož součástí je i naznačený mechanismus aktivace cukerného donoru za účasti sousedící

* Reakce 2,4-dialkoxypyrimidinů s halogenovanými cukry publikované v roce 1929.

skupiny působením TMSOTf a vzniku acyloxoniového kationtu. Obdobným mechanismem probíhá i aktivace chloridem cíničitým.²²

Schéma 2

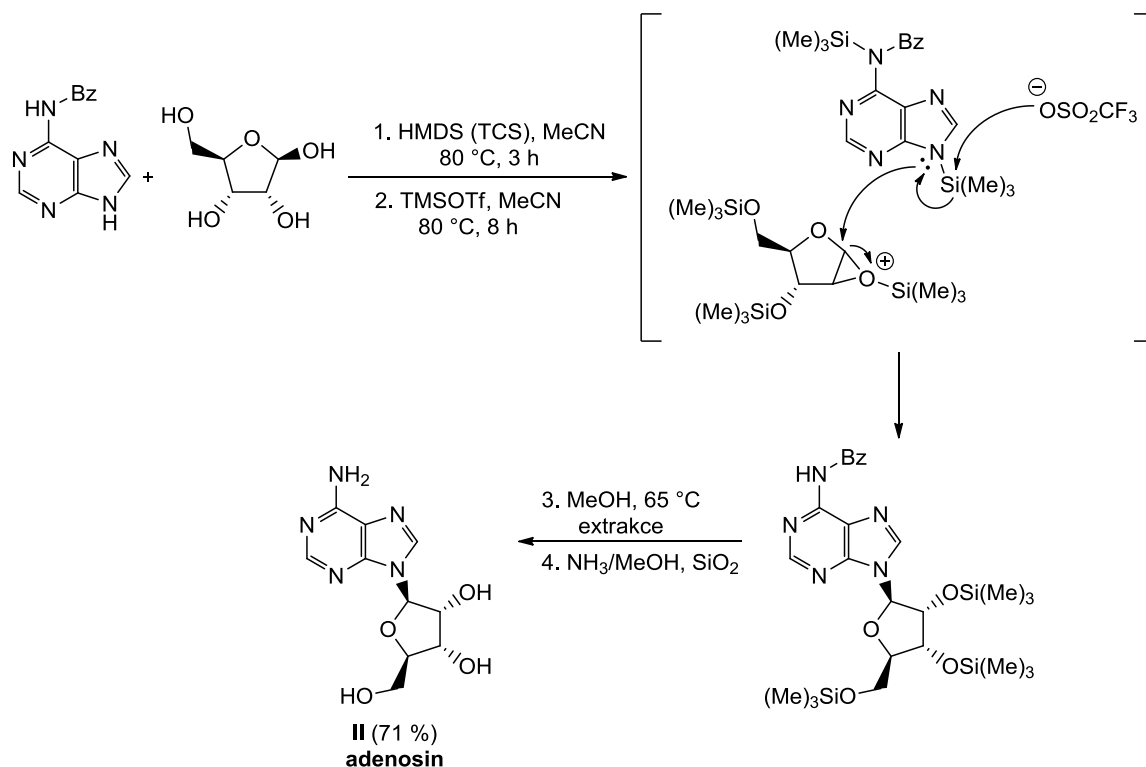


Dalo by se říci, že novější verzi Hilbertovy–Johnsonovy metody je tzv. Vorbrüggenova glykosylace. Typická Vorbrüggenova reakce vyžaduje předem silylovanou heterocyklickou bázi* (1. krok), která následně reaguje s glykosylovým donorem aktivovaným katalytickým množstvím Lewisovy kyseliny (2. krok).^{23,24}

Bennua, Krolikiewicz a Vorbrüggen publikovali v roce 1995 studii zabývající se persilylací D-ribosy a výchozího chráněného adeninu současně pomocí hexamethyldisilazanu (HMDS) s trimethylchlorsilanem (TCS).²⁵ TMSOTf byl přidán až v dalším kroku po odpaření přebytečného činidla a po závěrečné deprotekcii byl získán adenosin v celkovém výtěžku 71 % (Schéma 3).

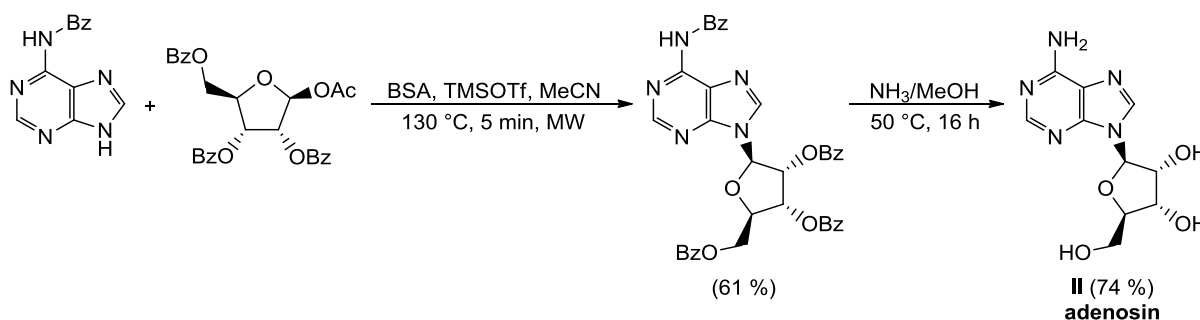
* Nejběžněji používaná silylační činidla v organické syntéze seřazená dle relativní silylační síly donoru: *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) > *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) > hexamethyldisilazan (HMDS).²⁶

Schéma 3



Na Schématu 4 je znázorněna reprodukce přípravy adenosinu dle postupu Vorbrüggena a spol.,^{21,27} který už před 25 lety dokázal, že lze oba kroky, silylaci a glykosylaci, sloučit v jeden, všechny reaktanty zahřívat společně a požadovaný produkt pak získat ve výtěžku až 81 %. Bookser a Raffaele tyto poznatky využili a reakci uskutečnili v podobě mikrovlnami asistované syntézy. Předem ochráněný adenin a acetylbenzoylovaná ribosa byly společně se silylačním činidlem BSA a aktivátorem TMSOTf zahřívány na 130 °C po dobu 5 minut v mikrovlném reaktoru. Po odstranění chránících skupin činil výtěžek 74 %.²³

Schéma 4

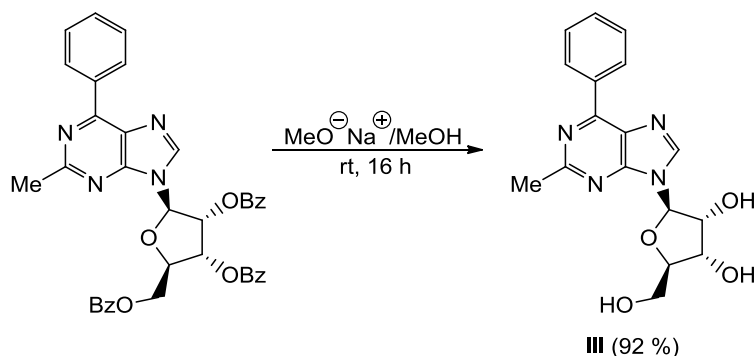


Všechny dosud diskutované glykosylační metody mají již své modifikace, které jsou neustále vylepšovány a rozšiřovány, případně aplikovány na jiné typy sloučenin.

Naproti tomu jsou podmínky deprotekcí reakcí pro rozmanité typy chránících skupin do jisté míry univerzální. Tímto krokem lze chránícími skupinami dočasně „zablokované“ hydroxylové skupiny na cukerné jednotce glykosidu snadno obnovit,

neboli ochránit. Při přípravě nukleosidů bývá tento krok zařazován buďto bezprostředně po navázání cukru na heterocyklickou bázi, nebo až na konec celé syntetické cesty. Z těch nejčastěji používaných lze uvést methanol nasycený amoniakem (viz Schéma 3 a 4), či roztok methoxidu sodného v methanolu (Schéma 5).²⁸

Schéma 5

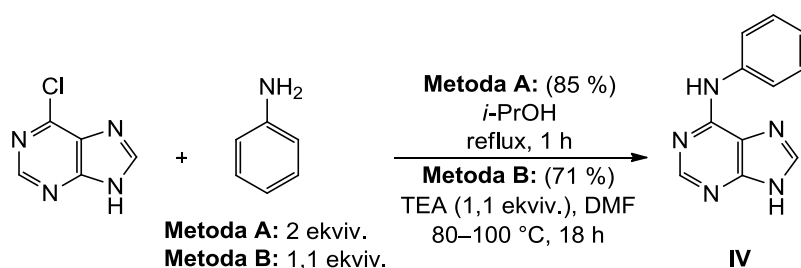


2.2 Nukleofilní substituce do poloh C6 a C2 purinových derivátů a nukleosidů

Purinové nukleosidy a jejich analogy se vyznačují enormní důležitostí především v oblasti medicíny, kde stabilně figurují jako zdroj antivirotické a protinádorové aktivity. Za tímto účelem je skupina těchto potenciálních chemoterapeutik neustále rozšiřována,¹⁴ nejčastěji prostřednictvím nukleofilní výměny vhodné odstupující skupiny v poloze 2 a 6 purinového skeletu.²⁹ Tradiční postup vedoucí k syntéze 2,6-aminodisubstituovaných purinových analogů představuje nahrazení atomu halogenu (nejčastěji atomu chloru) či oxoskupiny odpovídajícími aminy.

Na Schématu 6 jsou znázorněny dva příklady nukleofilní aromatické substituce atomu chloru komerčně dostupného 6-chlor-9*H*-purinu. Metodou A byl, reakcí výchozího purinu s anilinem v refluxujícím propan-2-olu bez účasti jakéhokoliv dalšího reaktantu, získán purinový derivát **IV** ve výtěžku 85%.³⁰ Naopak v případě Metody B byla substituce atomu chloru podpořena navíc přítomností triethylaminu.³¹ Zásadní rozdíl mezi oběma postupy činí množství anilinu vstupujícího do reakce. Bez podpory další báze je zapotřebí alespoň 2 ekvivalentů aminu na 1 ekvivalent výchozí látky, zatímco v druhém případě stačí pouze 1,1 molární přebytek anilinu na to, aby byl požadovaný produkt získán v uspokojivém výtěžku.

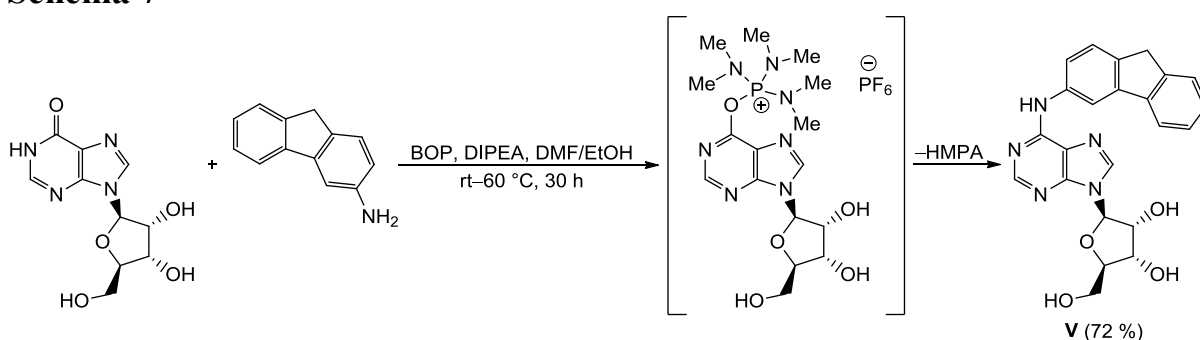
Schéma 6



Přestože je glykosylová vazba v purinových nukleosidech méně stabilní než u jejich pyrimidinových protějšků, lze i na jejich heterocyklické bázi provést celou řadu transformací.^{32,33}

Vcelku pokrokovou substituční metodu znázorňuje Schéma 7, kdy běžný protokol čtyřstupňové nukleosidové syntézy (proteckce → glykosylace ↔ substituce → deproteckce) svým způsobem modifikoval Wan a jeho výzkumná skupina.³⁴ Oxoskupina na inosinu je aktivována pomocí BOP* a po eliminaci molekuly hexamethylfosforamidu (HMPA) následuje navázání příslušného aminu do uvolněné polohy C6 v přítomnosti DIPEA a směsi rozpouštědel (DMF/ethanol). Autoři vyzkoušeli obdobné podmínky pro široké spektrum primárních, alifatických i aromatických, aminů a ve všech případech dosáhli výtěžků vyšších než 50 %.

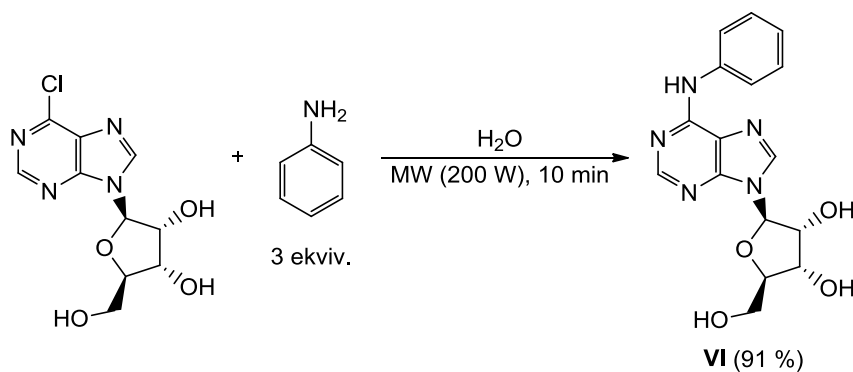
Schéma 7



Z výše uvedených reakcí je patrné, že nukleofilní substituce prováděné konvenčním způsobem mnohdy vyžadují dlouhou reakční dobu (hodiny, někdy i dny). Vedle nich jsou však čím dál častěji publikovány i rychlejší syntézy asistované mikrovlnami.

Například studie zabývající se vývojem „ekologické“ metody právě pro přípravu 6-substituovaných aminopurinů využívá pro navázání anilinu do polohy C6 u 6-chlor-9-(β-D-ribofuranosyl)-9H-purinu mikrovlnami asistovanou syntézu. Během 10 minut vznikl finální produkt VI ve velmi dobrém výtěžku (Schéma 8).³¹

Schéma 8

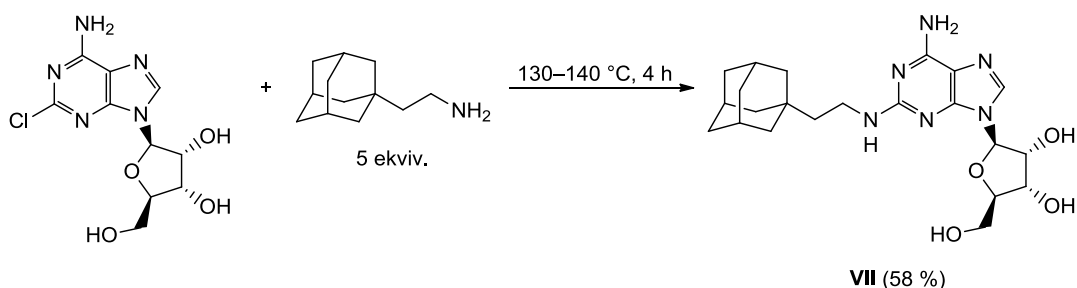


* 1-H-benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfát

Vzhledem ke svým významným biologickým účinkům se adenosin nejednou stává cílem nejrůznějších strukturních modifikací, zejména na atomu uhlíku C2 purinového kruhu. Protože je reaktivita vazby C6—Cl u 2,6-dichlorpurinů mnohem vyšší než u vazby C2—Cl, je výhodnější z nich nejprve připravit 2-chlorderiváty adeninu či adenosinu. Teprve při použití „drsnějších“ podmínek aminolýzy se získávají jejich 2,6-disubstituované aminoderiváty.³²

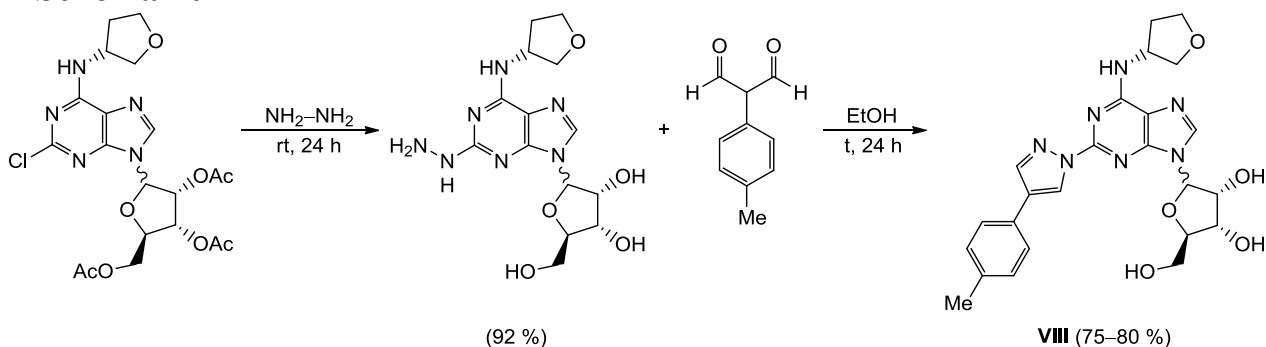
Vyvinutím vhodné metody pro nukleofilní substituci do C2 polohy 2-chloradenosinu se mimo jiné zabývali i Francis a kol.³⁵ Pro zavedení celé škály alifatických primárních i sekundárních aminů se jim osvědčilo vynechání rozpouštědla a výchozí nukleosid reagoval s pětinasobným přebytkem příslušného aminu při 130–140 °C. Na Schématu 9 je uveden konkrétní příklad, kdy reaktantem byl 2-(1-adamantyl)ethanamin.

Schéma 9



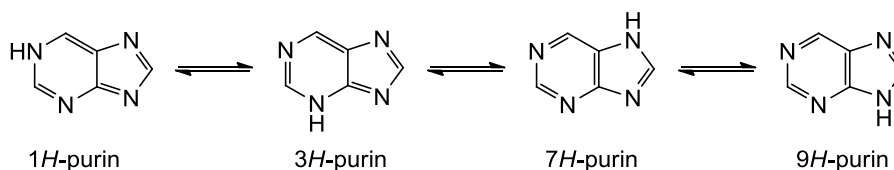
Dalším vyhledávaným způsobem je zavedení molekuly hydrazinu nebo některého z jeho derivátů namísto atomu chloru jako tzv. linkeru. Tato reakce trvá za laboratorní teploty přibližně 24 hodin a obvykle poskytuje uvažované produkty ve vysokých výtěžcích. Následnou transformací nebo prodloužením struktury hydrazinu je možné cíleně dospět například k látce **VIII**, která vznikla kondenzací 2-hydrazinyladenosinu s 2-(*p*-tolyl)malondialdehydem (Schéma 10).³⁶

Schéma 10



3 PURINOVÉ NUKLEOSIDY A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA

Jak v rostlinných, tak v živočišných organismech se vyskytuje velké množství látek, jejichž základní skelet tvoří dusíkatý heterocyklický systém, imidazo[4,5-*d*]pyrimidin, běžně však nazývaný purin, poprvé popsáný E. Fischerem v roce 1884.^{37,38} Téměř na všech atomech přítomných v obou aromatických cyklech jsou prováděny různé modifikace (Obrázek 3). Všechny takové sloučeniny pak lze zařadit pod souhrnný pojem puriny.



Obrázek 3: Možné tautomery purinu.

Nemalou část purinů představují purinové nukleosidy, jež mají samy o sobě mnohostranný význam. Dalo by se říci, že logickým počátkem výčtu zástupců jsou adenosin a guanosin, jejichž nejdůležitější funkcí je přítomnost v řetězcích nukleových kyselin. Odtud se jejich důležitost překlenuje prostřednictvím řady derivátů účastnících se mnoha metabolických pochodů, z nichž klíčovým je proces pro přenos energie v organismu, jinými slovy interkonverze fosfátových esterů obou jmenovaných nukleosidů. Avšak purinové nukleosidy mohou také zastávat funkce signálních molekul, neurotransmiterů a koenzymů či jejich součástí.²⁹

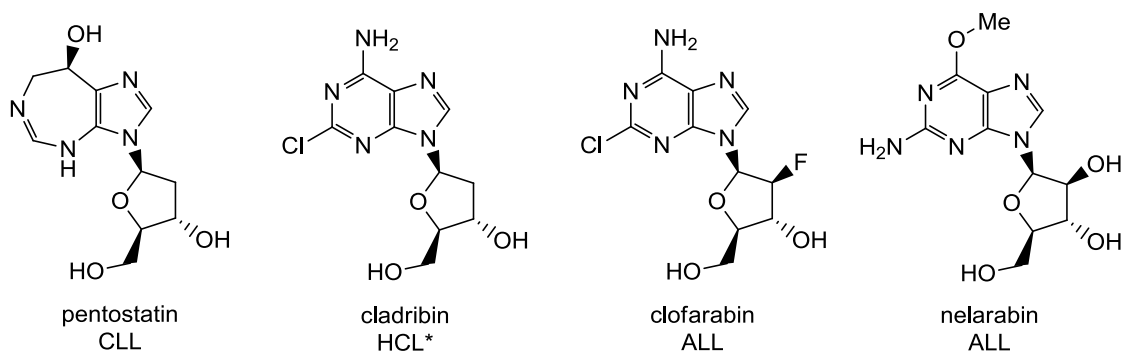
Právě z těchto důvodů bývají připravovány syntetické deriváty přírodních nukleosidů, u nichž jsou následně testovány biologické účinky a později prováděny klinické testy pro jejich možné využití v medicíně.³² V organismu tyto látky velmi často působí jako antimetabolity. Mohou mít přímý inhibiční účinek na dílčí reakce intermediárního metabolismu, nebo na enzymy, jejichž aktivita je nutná pro normální průběh biosyntetických reakcí.³⁹ Ovlivňují tak například syntézu a opravy DNA, či hromadění zlomů v řetězci DNA. Jako závěrečnou akci jsou schopny navodit apoptózu.⁴⁰

3.1 Cytostatika

Purinové nukleosidy jako cytotoxická a cytostatická léčiva mají své místo zejména v léčbě hematologických nádorových onemocnění, kam patří i leukemie – zhoubné poruchy krvetvorby. Jedná se o klonální onemocnění charakterizované hromaděním a rozšířením nádorových buněk v kostní dřeni a důležitých orgánech, což vede až k hemopoetickému selhání organismu. Dle typu postižených krvetvorných buněk, v nichž došlo ke vzniku nádoru, se leukemie dělí na myeloidní (myelocyt (M) = buňka v kostní dřeni) nebo lymfocytární (lymfocyt (L) = typ bílé krvinky). Akutní leukemie (AL) je rychlá forma, při níž postižené

buňky nejsou schopny se plnohodnotně vyvinout, jejich schopnost diferenciacie je snižena, nebo ji úplně ztratily. Průběh chronické leukemie (CL) je naopak pomalý, buňky s maligními rysy dosahují dospělosti a mohou se rozšiřovat, ale nepodléhají apoptóze tak rychle jako jejich zdravé fyziologické protějšky.^{41,42}

Obrázek 4 znázorňuje různá již řadu let chemoterapeuticky využívaná antileukemika.



Obrázek 4: Klinicky využívaná antileukemika.^{43–46}

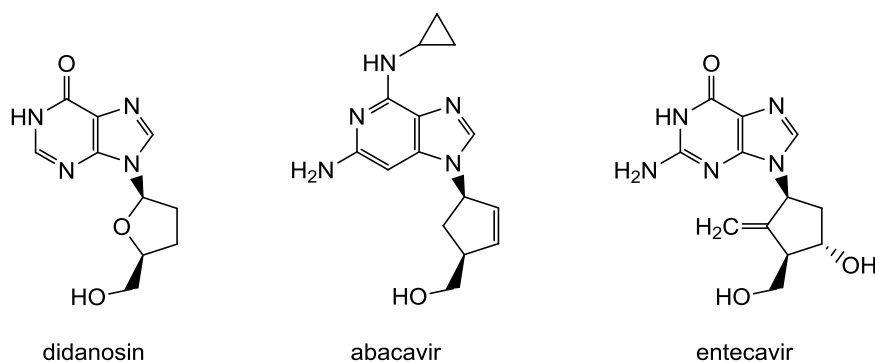
3.2 Antivirotika

Zcela oprávněně se o virech mluví jako o nejjednodušší formě života. Jejich „organismus“ tvoří vlákno DNA nebo RNA s proteinovým obalem, nemají vlastní metabolický aparát, pouze omezenou enzymovou výbavu, která umožňuje jejich proniknutí do hostitelské buňky a „nastartování“ replikace. Dále jsou již zcela závislé na svém hostiteli a plně využívají jeho buněčnou výbavu.

Mezi virová onemocnění se řadí například chřipka, spalničky, opary vyvolané různými herpetickými viry, hepatitida (zánět jater), vzteklna, dětská obrna, pravé neštovice, HIV/AIDS nevyjímaje.

Inhibitory nukleosidové reverzní transkriptasy (NRTIs) jsou první antiretrovirální skupinou látek, která prokázala efektivitu právě vůči viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV – *Human Immunodeficiency Virus*). Tyto látky vystupují jako hlavní složky vysoce účinné antiretrovirální terapie (HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*), kdy v kombinaci s dalšími léky snižují riziko šíření viru. Do skupiny nukleosidových inhibitorů na bázi purinu patří didanosin, abacavir a entecavir (Obrázek 5).^{47,48}

* vlasatobuněčná leukemie (HCL – *Hairy Cell Leukemia*)



Obrázek 5: Purinové inhibitory nukleosidové reverzní transkriptasy.

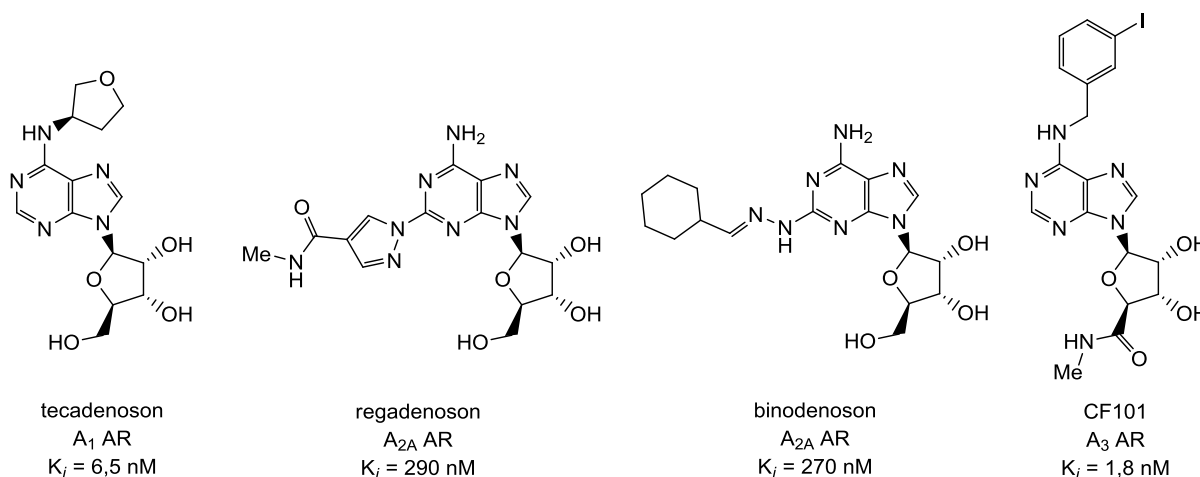
3.3 Agonisté adenosinového receptoru

V posledních letech zažívá purinová chemie něco jako obrození. Velký rozvoj zaznamenalo zejména studium adenosinových receptorů (AR). Receptory jsou makromolekuly, jejichž fyziologickým úkolem je vázat biologicky účinné látky a převádět tuto vazbu na efekt, tedy na změnu buněčné funkce. Existují receptory různého složení a také s rozdílnými způsoby transdukce signálu.⁴⁹

Adenosinové receptory náleží do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem a existují čtyři známé podtypy – A₁, A_{2A}, A_{2B} a A₃, jež se vyskytují téměř v celém lidském těle a detekují lokální změnu koncentrace adenosinu.^{15,50}

Afinita k adenosinovým receptorům (K_i) je definována jako poměr rychlosti disociace k asociaci léčiva na receptor. Čím je stanovená hodnota vyšší, tím nižší je afinita.⁵¹ Samotný adenosin má vysokou afinitu k A₁ a A_{2A} AR (K_i = 0,3–20 nM), zatímco k receptorům A_{2B} a A₃ tak výrazná není (K_i = >1000 nM).⁵²

Na Obrázku 6 je uveden výběr několika agonistů adenosinového receptoru.



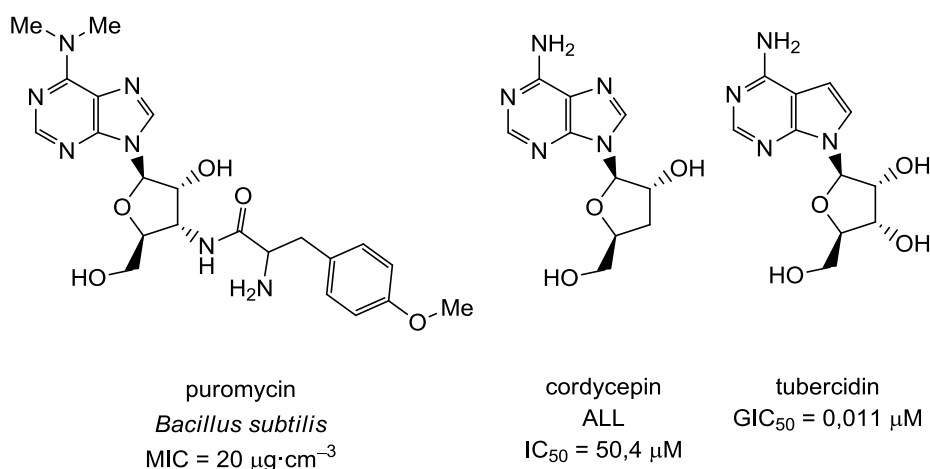
Obrázek 6: Agonisté adenosinového receptoru.^{53–56}

Adenosinové receptory jsou atraktivním cílem pro výzkum terapeutických účinků v široké škále onemocnění, jako je astma, Parkinsonova choroba, hypoxie (nedostatek kyslíku v organismu) a mnoho dalších.

Purinové sloučeniny se celkově staly také středobodem vývoje genetické terapie, biologických sond a moderní technologie sekvenování DNA, jejichž prostřednictvím se rovněž daří proniknout do molekulárních mechanismů chemické karcinogeneze a oprav DNA.^{57,58}

3.4 Antibiotika

Nukleosidová antibiotika slouží zejména jako důležitý nástroj ke zkoumání mechanismů biochemických reakcí. Primárně se jedná o biosyntézu nukleových kyselin a proteinů. Dnes je známo více než dvacet nukleosidových antibiotik, v nichž aglykonovou (necukernou) složku tvoří purinová nebo pyrimidinová báze.^{59,60} Některá přírodní antibiotika jsou uvedena na Obrázku 7.

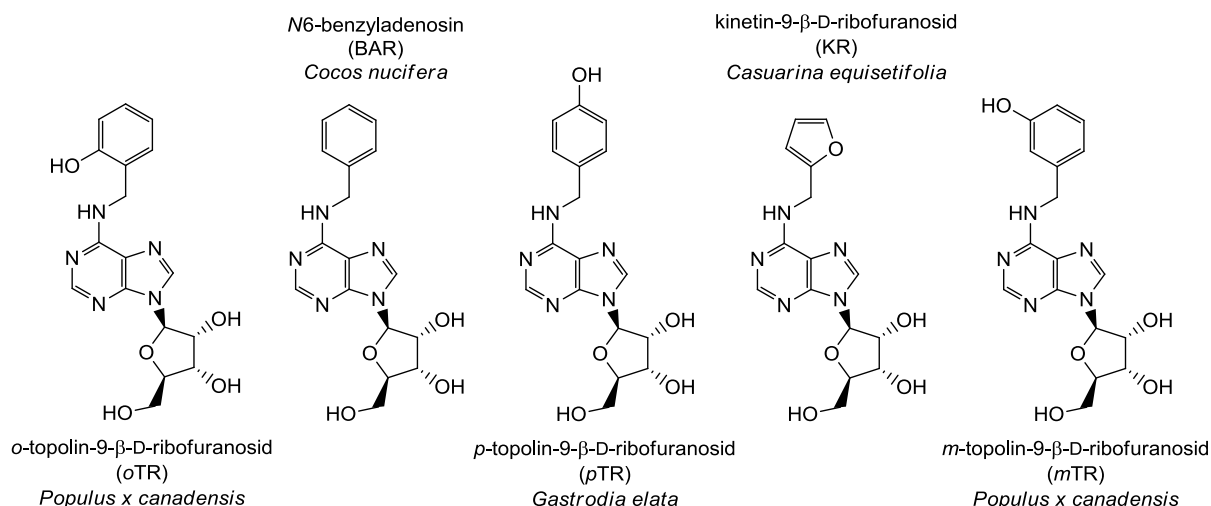


Obrázek 7: Vybraná přírodní nukleosidová antibiotika.^{61–63}

3.5 Cytokininové ribosidy

Pod názvem cytokininy je zahrnuta skupina rostlinných hormonů a bioregulátorů, které mnohostranně ovlivňují růst a vývoj rostlin. Endogenní cytokininy stimulují buněčné dělení, fotomorfogenezi, vznik chloroplastů, biosyntézu pigmentů, regulují růst kořenů, výhonků a celkovou stavbu rostliny.⁶⁴

V mnohem nižších koncentracích než volné cytokininy existují v rostlinách také jejich ribosidy (Obrázek 8).⁶⁵ Například nejhojnější *o*-topolin-9- β -D-ribofuranosid se v topolových listech za rozbřesku vyskytuje až v mikromolárních koncentracích. Podle autory provedených výzkumů závisí hladina tohoto cytokininu jak na světelných podmínkách, tak na stupni rozvinutosti listu.⁶⁶



Obrázek 8: „Aromatické“ cytokininové ribosidy.^{65,67}

Dříve se mělo za to, že glykosidové konjugáty cytokininů (nesoucí v poloze 9 purinového kruhu ribosu nebo glukosu) jsou jen transportní, zásobní a především neaktivní formy.⁶⁸ Avšak na bázi hlavní funkce těchto fytohormonů se zrodil předpoklad, že by stejně tak, jak ovlivňují růst a diferenciaci buněk u rostlin, mohly totéž vykonávat i u živočichů. Následně byly u těchto látek skutečně prokázány antiproliferační účinky na živočišné nádorové buňky (Tabulka 1).⁶⁹

Tabulka 1: Antiproliferační aktivita cytokininových ribosidů.

Ribosid (zkratka)	IC ₅₀ [μM]					
	CEM	HL60	K562	MCF7	HeLa	BJ
iPR	1,7	0,7	5,2	6,9	5,5	2,5
tZR	>166	95,9	>166	>166	>166	>166
cZR	18,8	7,9	>166	>166	42,3	55,2
mTR	>166	24,0	>166	>166	>166	3,9
oTR	0,5	0,6	2,4	3,1	2,1	1,5
pTR	>166	7,5	>166	>166	>166	15,3
BAR	1,3	0,9	5,9	3,7	1,9	1,7
KR	1,6	0,8	10,5	4,3	4,3	2,1

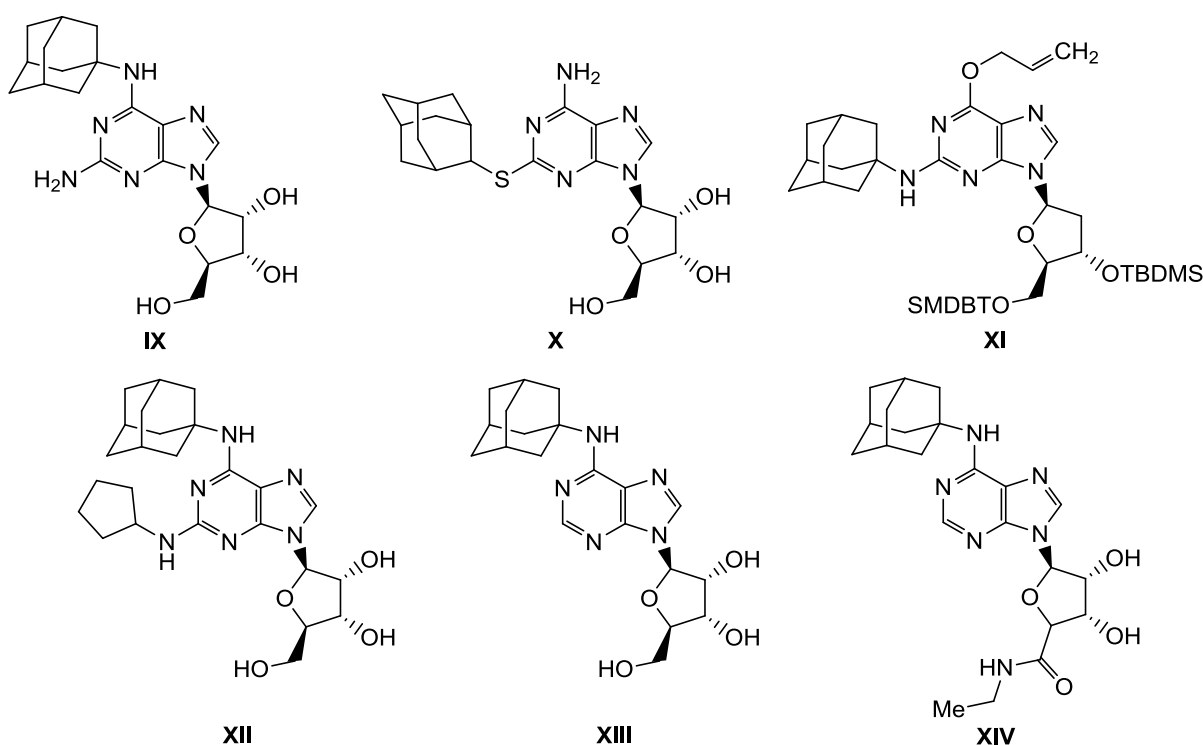
Pozn.: zkratky použitých buněčných linií: CEM – T-lymfocytární leukemie, HL60 – promyelocytární leukemie, K562 – chronická myeloidní leukemie, MCF7 – karcinomu prsu, HeLa – karcinomu děložního čípku, BJ – lidských fibroblastů z předkožky; >166 = 166 μM – nejvyšší použitá koncentrace

U některých cytokininových ribosidů byla zjišťována také afinita vůči adenosinovému receptoru A_{2A} (ZR K_i = 2,9 μM, KR K_i = 17 μM, p-TR K_i = 10 μM). p-TR prokázal shodnou vazebnou odezvu i vůči receptoru A₃ AR. Mimo to dokáže také blokovat adenosinový přenašeč ENT-1 (rovnovážný nukleosidový transportér, *Equilibrative Nucleoside Transporter*). Objev této současné duální funkce p-TR odstartoval velmi přínosnou strategii v léčbě Huntingtonovy choroby.^{70–73}

4 ADAMANTAN V PURINOVÝCH NUKLEOSIDECH

Rešeršní průzkum související s problematikou řešenou v této práci prokázal, že do současnosti bylo připraveno jen několik málo purinových nukleosidů obsahujících adamantanový skelet. Strukturní vzorce dotyčných sloučenin jsou znázorněny na Obrázku 9.^{74–79}

U sloučenin IX–XIV byla vedle syntézy samotné studována a také potvrzena biologická aktivita. Nukleosid XII vykazuje antiprotozoální účinky vůči *Trypanosoma brucei rhodesiense* způsobující východoafrickou akutní formu spavé nemoci ($IC_{50} = 34,1 \mu M$)⁷⁷ a sloučenina XIII aktivuje adenosinový receptor A_1 laboratorních krys ($K_i = 73 \text{ nM}$).⁷⁸ Téměř o 15 let později byla obdobná schopnost potvrzena i u látky XIV ovšem tentokrát vůči savčím A_1 AR receptorům ($EC_{50} = 4,0 \mu M$).⁷⁹



Obrázek 9: Dosud připravené adamantylované purinové nukleosidy.

Uvedené hodnoty biologické aktivity nukleosidů na bázi adamantanu však nelze v kontextu jiných známých nukleosidů považovat za příliš významné. Příčinou může být přílišná blízkost adamantanového skeletu k purinovému kruhu a z toho plynoucí sterické bránění purinového skeletu. Toto těsné sousedství pak může vést například k nemožnosti navázání inhibitoru do aktivního místa buněčného cíle (např. enzymu). Z tohoto důvodu je nasnadě upravení struktury obdobných sloučenin tak, aby vzdálenost adamantylových substituentů byla od purinového jádra větší.

Naše výzkumná skupina se již několik let věnuje syntéze nových sloučenin nesoucích adamantanový motiv, kdy jako vhodné pro zavedení na purinový skelet se jeví aromatické aminy na bázi adamantanu, jejichž syntéza a schopnost vytvářet

supramolekulární komplexy s β -cyklodextrinem (β -CD) byly popsány v dříve publikovaných pracích.⁸⁰

Zabudováním adamantylového zbytku do struktury vybrané sloučeniny dochází ke zvýšení její lipofility, v důsledku čehož může dojít ke zlepšení její schopnosti projít buněčnou membránou,⁸¹ což představuje neodmyslitelnou nutnost pro účinnost léčiv v živých organismech. Na základě těchto znalostí a s velkým potenciálem byla připravena sada originálních 2,6,9-trisubstituovaných purinů, jež v poloze C2 purinového skeletu nesly atom chloru anebo zbytek aminoalkoholu (3-aminopropan-1-olu), v poloze C6 pak výše zmíněné aromatické aminy na bázi adamantanu a konečně poloha N9, stejně jako u roscovitinu, byla obsazena nepříliš objemným nepolárním propan-2-ylovým substituentem.⁸²

Přestože následné testování biologické aktivity přineslo pozitivní výsledky, značně jej zkomplikovala omezená rozpustnost připravených sloučenin v polárním prostředí. Právě zde bylo efektivně využito schopnosti nových látek tvořit inkluzní komplexy s β -CD, kdy došlo k prokazatelnému zlepšení rozpustnosti, a to bez negativního dopadu na biologickou aktivitu.

Výše uvedené úspěchy nás motivovaly ještě rozvinout zkoumanou problematiku a rozhodli jsme se propan-2-yl na N9 nahradit polárnějším cukerným „alkoholem“ za získání přírodě bližších nukleosidů.

5 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Impulzem pro sepsání předkládané práce nejen o glykosylačních metodách vedoucích k purinovým nukleosidům bylo navázat na studii zabývající se syntézou a studiem biologické aktivity 2,6,9-trisubstituovaných purinů nesoucích ve své molekule adamantanový motiv.

Na základě poznatků získaných během rešeršního průzkumu byla vytvořena předběžná posloupnost reakcí, které bude nutné v rámci plánované multikrokové syntézy provést, stejně jako následně experimentálně ověřit ony vybrané metody pro přípravu jednotlivých komponent, a sice výchozích sloučenin, modelových purinových derivátů a adamantylem modifikovaných purinů.

Série optimalizačních reakcí na modelových sloučeninách by měla vést k nalezení použitelných glykosylačních podmínek, aby pak jejich prostřednictvím a vzájemnou kompletačí předchystaných stavebních jednotek mohly být úspěšně obdrženy tzv. prekurzory nukleosidů. Odblokováním těchto prekurzorů budou pak získány finální 6-substituované a 2,6-disubstituované purinové nukleosidy s případnou možností dalších modifikací na purinové bázi.

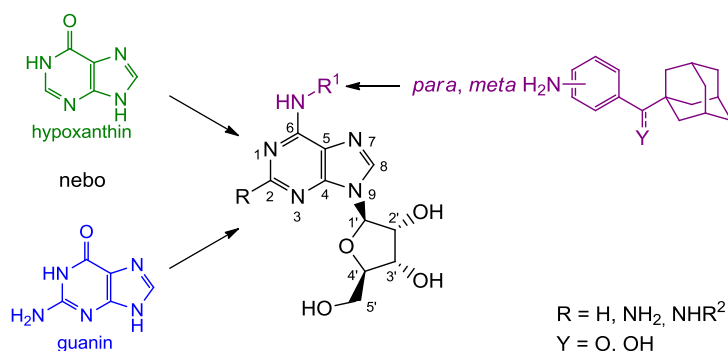
Závěrečným krokem bude u připravených látek provedena kompletní charakterizace pomocí metod strukturní analýzy a také screening a vyhodnocení jejich případné biologické aktivity na vybraných buněčných cílech.

DISKUZE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

6 MULTIKROKOVÁ SYNTÉZA PURINOVÝCH RIBONUKLEOSIDŮ

Alfou a omegou této disertační práce bylo připravit ucelenou sérii nových 6-substituovaných a 2,6-disubstituovaných purinových ribonukleosidů obsahujících adamantanový skelet za účelem následného zkoumání jejich účinků vůči vybraným buněčným cílům.

Tyto dvě zmíněné skupiny nukleosidů měla vycházet ze dvou jednoduchých purinových derivátů za vzniku jedné série látek s atomem vodíku v poloze C2 purinového kruhu a druhé s primární amnoskupinou na stejném místě. Poloha C6 byla zvolena pro obsazení substituenty nesoucími 1-adamantyl (Obrázek 10).

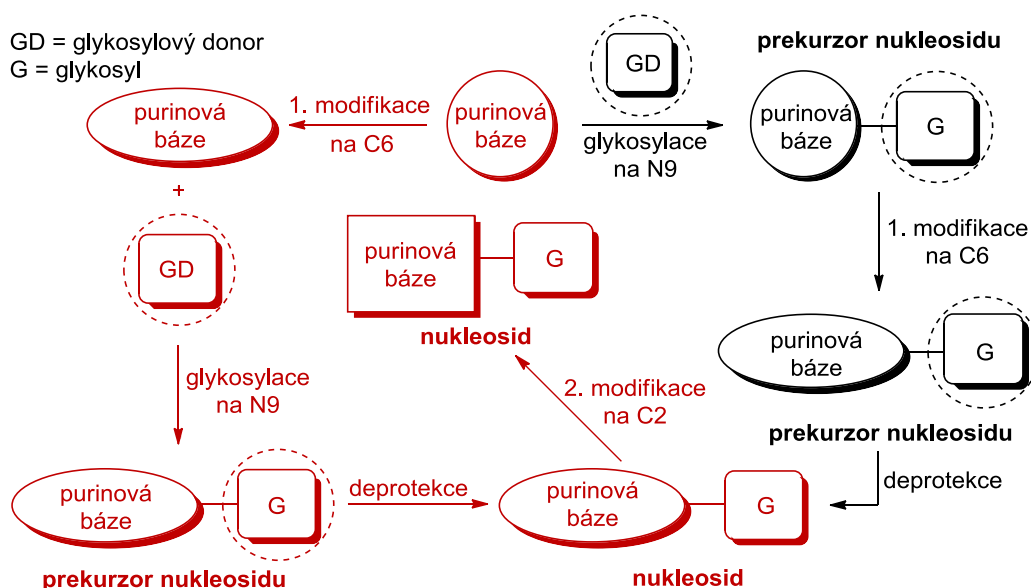


Obrázek 10: Obecná struktura připravovaných nukleosidů.

Každá vize na vytvoření dosud nepopsaných látek, které by v budoucnu mohly najít praktické využití, je doprovázena myšlenkou na to, aby syntetická cesta byla efektivní a časově i finančně co možná nejméně náročná.

Tvorba nukleosidů standardně čítá tři základní kroky a může se ubírat dvěma směry. Nejčastěji vypadá následovně: do polohy N9 purinové báze je zaveden zbytek z glykosylového donoru, jehož hydroxylové skupiny bývají zablokovány chránicími skupinami. Před i po samotném navázání glykosylu na danou sloučeninu se řadí případné modifikace purinové báze, a ne vždy nutně na závěr dochází k odstranění chránících skupin z cukerné části a vzniku cílového nukleosidu.

K dosažení stanovených cílů jsme zvolili sled reakcí zvýrazněných na Obrázku 11 červenou barvou. V rámci tohoto postupu jsou vybrané purinové báze nejprve substituovány v poloze C6 deriváty adamantanu, následně glykosylovány ochráněným monosacharidem, z něhož jsou v dalším kroku chránicí skupiny odstraněny, a celá syntéza je ukončena druhou modifikací purinové báze další substitucí, tentokrát v poloze C2 purinového kruhu (tento krok se týká pouze 2,6-disubstituovaných purinových ribonukleosidů).



Obrázek 11: Obecné znázornění přípravy a možných modifikací nukleosidů.

6.1 Příprava adamantylových substituentů a dalších výchozích látek

Příprava aromatických aminů na bázi adamantanu

Ve studiích naší výzkumné skupiny zabývajících se vývojem nových sloučenin na bázi adamantanu se již několikrát objevila před lety vyvinutá syntéza různě „dlouhých“ 1-adamantyl(alkyl/aryl)aminů vycházející z adamantan-1-karboxylové kyseliny (Schéma 11).^{80,82,83}

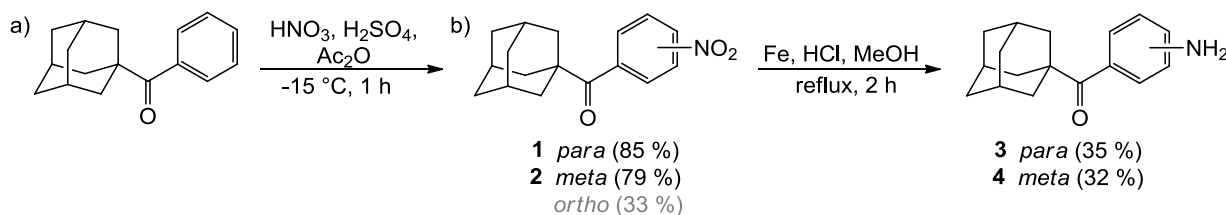
Struktury těchto sloučenin, stejně jako syntetická cesta vedoucí k nim, byly navrženy mimo jiné na základě úvahy o jejich možné orientaci v aktivním místě cyklin-dependentních kinas (konkrétně heterodimerního komplexu CDK2/cyklin E), pro jejichž inhibici byly tyto „stavební bloky“ syntetizovány a posléze implementovány do polohy C6 purinového skeletu. Jelikož z předchozích projektů realizovaných v naší výzkumné skupině zůstalo nevyužito větší množství 1-adamantyl(fenyl)methanonu, byla příprava potřebných sloučenin zahájena jeho nitrací, která je znázorněna na Schématu 11a.

Samotná elektrofilní aromatická substituce výchozího ketonu byla provedena ověřeným postupem za vzniku odpovídajících *ortho*, *meta* a *para* regioisomerů v přibližném poměru 1:1:1 (dle GC-MS). Pro oddělení jednotlivých isomerů bylo nutné provést několikanásobnou sloupcovou chromatografii s tím, že *ortho* derivát již v dalších syntézách nebyl využit. Důvodem byl předpoklad vzniku sterického bránění purinového skeletu uvažovaných sloučenin.

Následně byly 1-adamantyl(nitrofenyl)ketony **1** (*para*) a **2** (*meta*) podrobeny selektivní redukcí vodíkem (Schéma 11b) vznikajícím *in situ* z reakce práškového pentakarbonylového železa s kyselinou chlorovodíkovou v methanolu (1:1, *v:v*). Sloučeniny **3** a **4** byly po přečištění pomocí sloupcové chromatografie získány ve vysokých výtěžcích a čistotě vhodné pro jejich použití v dalších reakcích.

Struktura sloučenin 1–4 byla určena pomocí běžných spektrálních metod (IR, NMR, ESI-MS) s tím, že získaná spektra byla srovnána se spektry těchto látek připravených v naší výzkumné skupině v předcházejících letech.⁸²

Schéma 11



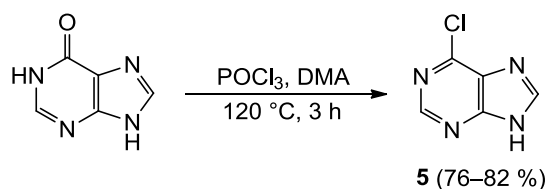
Chlorace hypoxanthinu

Přestože jsou chlorderiváty purinu, které jsme pro syntézu námi uvažovaných látek potřebovali, komerčně dostupné, rozhodli jsme se vydat cestou jejich přípravy z dostupných prekurzorů, konkrétně z hypoxanthinu a guaninu. Tyto se jeví jako ideální výchozí sloučeniny pro obě zamýšlené série ribonukleosidů splňující požadované podmínky substituce polohy C2 purinového jádra – hypoxanthin s atomem vodíku a guanin s primární aminoskupinou.

Aby však byly obě výše zmíněné výchozí sloučeniny použitelné i pro další syntetické kroky, bylo nejprve nutné provést nahrazení oxoskupiny na C6 purinového skeletu za atom chloru. V případě hypoxanthinu tento krok nečinil žádný větší problém. Po provedení modelové chlorace hypoxanthinu (v množství 200 mg výchozí látky) pomocí fosforyl chloridu v *N,N*-dimethylanilinu (DMA) byl získán požadovaný 6-chlor-9*H*-purin (5) ve výtěžku převyšujícím 80 %, stejně jako v publikaci,⁸⁴ z níž jsme postup převzali. Vhodnost reakčních podmínek byla následně potvrzena také při použití většího množství výchozí látky (1,5 g), i když byl uvažovaný produkt získán v o něco nižším výtěžku, a sice 76 % (Schéma 12).

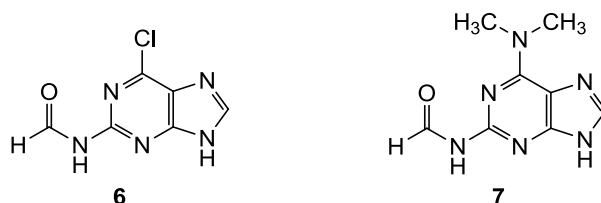
Jedinou komplikací celého procesu bylo, že při neutralizaci reakční směsi vodným roztokem hydroxidu amonného docházelo k postupné tvorbě modrého zbarvení způsobeného vznikem krystalové violeti. Tu bylo však možné z vodného podílu odstranit extrakcí do chloroformu, a to bez obav ze ztráty produktu, jelikož 6-chlor-9*H*-purin je v chloroformu rozpustný jen velmi omezeně.

Schéma 12



V případě guaninu se tuto konverzi však provést nezdařilo. Po opakovaných selháních různých vyzkoušených metod, mimo jiné získání nežádoucích sloučenin 6 a 7 (Obrázek 12), jsme se rozhodli syntézu 2,6-disubstituovaných nukleosidů

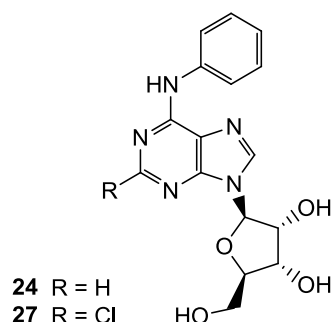
provádět z výchozího 2,6-dichlor-9*H*-purinu, který byl již dříve zakoupen od společnosti ApliChem. Oproti původně zamýšlené základní struktuře jedné připravované série látek tak došlo ke změně, kdy namísto aminové skupiny v poloze 2 purinového kruhu zde byl atom chloru s možností jeho budoucího nahrazení vhodným substituentem.



Obrázek 12: Nežádoucí produkty vzniklé během chlorací guaninu.

6.2 Příprava purinových derivátů a jejich glykosylace

Glykosylační reakce, přestože jsou léty ověřené a nesčetněkrát zopakované, málokdy probíhají dle prvotního předpokladu. Z tohoto důvodu, ještě než bylo přistoupeno k přípravě zamýšlených nukleosidů, v jejichž struktuře se měl vyskytovat adamantanový motiv, byly všechny zvolené reakční podmínky vycházející z dostupné literatury nejen pro glykosylace, ale i pro nukleofilní aromatické substituce purinového skeletu a další reakce, nejdříve vyzkoušeny s modelovým substituentem, kterým byl anilin. Takto byly připraveny sloučeniny **24** a **27** (Obrázek 13), které v poloze C6 purinového kruhu nesou sekundární aromatický amin, pocházející z anilinu, a v poloze C2 atom vodíku nebo atom chloru. Dalším důvodem, proč nebyla poloha C6 purinových derivátů rovnou obsazena aromatickými aminy s 1-adamantylem, byl fakt, že jsou tyto látky pro optimalizaci syntetické cesty příliš cenné. Byla-li pak aplikace reakčních podmínek vedoucí k látkám **24** a **27** úspěšná, následovalo jejich použití i při syntéze uvažovaných sloučenin obsahujících ve své molekule adamantanový skelet.



Obrázek 13: „Modelové“ nukleosidy nesoucí sekundární aromatický amin v poloze C6 purinového kruhu.

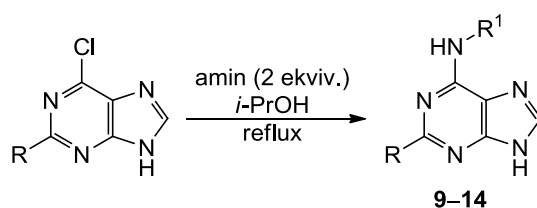
6.2.1 Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze C6

Nukleofilní aromatická substituce atomu chloru v poloze C6 6-chlor-9*H*-purinu (**5**) a 2,6-dichlor-9*H*-purinu byla prováděna pomocí nadbytku aromatického aminu

ve vroucím propan-2-olu.³⁰ Zvolené reakční podmínky vychází ze zkušeností nabytých v naší výzkumné skupině v uplynulých letech, kdy se tyto jeví při provádění tohoto typu reakce jako nejvhodnější.

Jak je uvedeno výše, pro ověření vhodnosti reakčních podmínek byly nejprve provedeny syntézy s modelovým substituentem, jímž byl anilin (Schéma 13, reakce 1 a 4). V obou případech došlo během několika hodin k vysrážení žlutého krystalického prášku, který bylo možné odfiltrovat za sníženého tlaku. Získané pevné podíly byly následně opakovaně promyty ledovým propan-2-olem (z důvodu odstranění nezreagovaného anilinu) a překrystalizovány ve směsi methanol/chloroform. Uvažované sloučeniny **9** a **12** byly získány ve vysokých výtěžcích a v dostatečné čistotě.

Schéma 13



Reakce	R	Amin	Reakční doba [h]	Produkt	R ¹	Výtěžek [%]
1	H		3	9		96
2	H		5	10		96
3	H		5	11		91
4	Cl		4	12		95
5	Cl		24	13		94
6	Cl		14	14		90

Struktura a čistota sloučenin **9** a **12** byla ověřena pomocí běžně používaných metod.

Stejným způsobem byly do polohy 6 obou výchozích purinových derivátů zavedeny také 1-adamantyl(aminofenyl)ketony **3** a **4**. Reakce 2, 3, 5 a 6 (Schéma 13) proběhly rovněž bez komplikací a požadované sloučeniny byly izolovány ve vysokých výtěžcích (90–96 %). Jediným rozdílem oproti nukleofilní aromatické substituci atomu chloru na C6 prováděné s modelovým substituentem a výchozím 2,6-dichlor-9H-purinem se nakonec ukázal být delší reakční čas (14–24 h) nutný

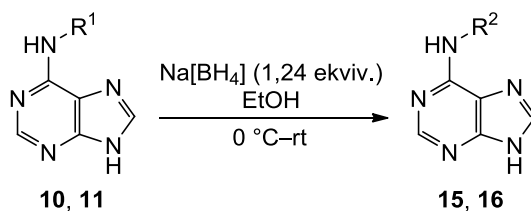
pro syntézu sloučenin **13** a **14**. Připravené sloučeniny byly, stejně jako ve shora uvedených případech, podrobeny charakterizaci pomocí spektrálních metod, jako je IR, ESI-MS či NMR.

6.2.2 Redukce karbonylové skupiny u purinových derivátů s atomem vodíku v poloze C2

Příprava adamantylovaných substituentů uvedená na Schématu 11 (str. 25) zahrnuje v dalších krocích také provedení redukce karbonylové skupiny, a to buď ihned na získaných nitroderivátech, nebo až na následně připravených aminoderivátech.⁸⁰ Nicméně, po zkušenostech nabytých Davidem Gergelou v rámci jeho diplomové práce⁸⁵ zabývající se rovněž syntézou purinových derivátů s adamantylovým skeletem, kdy během zavádění „*para* aminoalkoholu“ do polohy 6 u 6-chlor-9*H*-purinu v propan-2-olu docházelo na adamantylovém substituentu k nežádoucí reakci a ke vzniku propyloxyderivátu, bylo rozhodnuto, že pořadí těchto dvou kroků bude změněno a redukce karbonylové skupiny bude provedena až po úspěšně provedené nukleofilní aromatické substituci purinových derivátů v poloze C6.

Jelikož tento typ reakce nebylo možné vyzkoušet na modelových látkách, bylo nejprve přistoupeno k redukcí karbonylových skupin purinů **10** a **11**. Obě výchozí sloučeniny byly rozmíchány v ethanolu a ke vzniklým nažloutlým suspenzím ochlazeným na 0 °C bylo přidáno odpovídající množství tetrahydridoboritanu sodného. Reakce následně probíhaly za laboratorní teploty a jejich průběh byl monitorován pomocí TLC (Schéma 14). V okamžiku spotřebování výchozí látky bylo přistoupeno ke zpracování reakčních směsí, přičemž v obou případech byl pozorován vznik bezbarvé sraženiny, která byla odfiltrována. Získané surové produkty byly následně přečištěny sloupcovou chromatografií. Požadované produkty pak byly získány v izolovaných výtěžcích 88 a 93 %.

Schéma 14



Reakce	Výchozí sloučenina	R ¹	Reakční doba [h]	Produkt	R ²	Výtěžek [%]
1	10		22	15		88
2	11		24	16		93

6.2.3 Glykosylace

Komerčně dostupná 1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosa (dále v textu označovaná jako „chráněná ribosa“), zakoupená od společnosti Sigma Aldrich, představuje finančně dostupný monosacharidový prekurzor, který je zvláště užitečný při stereochemicky kontrolovaných syntézách. Prostřednictvím glykosylace byl 2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl napojen na atom dusíku v poloze 9 předpřipravených purinových akceptorů. Vzhledem k relativní vzácnosti používaných adamantylových reaktantů byly glykosylační podmínky opět nejprve testovány a optimalizovány na modelových purinech **9** a **12**.

Na základě rešerše se jako vhodné jevílo katalyzovat glykosylační reakce Lewisovými kyselinami (LK), konkrétně chloridem cíničitým či trimethylsilyl-triflátem (TMSOTf), jichž bývá využíváno nejhojněji.^{86,87}

Optimalizace podmínek glykosylačních reakcí

Na samotném počátku jsme zjišťovali, s jak velkým přebytkem monosacharidu bude potřeba do glykosylací vstupovat. Reakční podmínky, jakož i molární přebytek chráněné ribosy (vztahené vůči výchozímu purinu), která byla vložena do glykosylace katalyzované chloridem cíničitým, jsou uvedeny na Schématu 15.

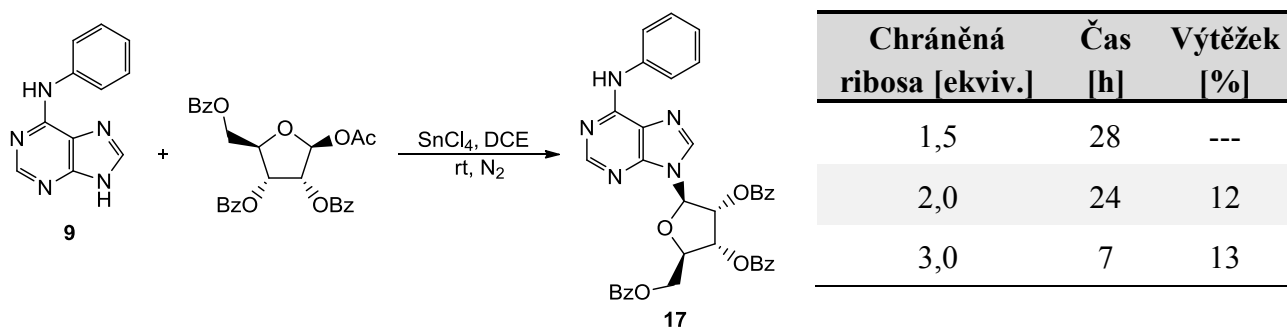
Purin **9** byl za laboratorní teploty pod inertní dusíkovou atmosférou ponechán postupně reagovat s 1,5, 2,0 a 3,0 molárním přebytkem ribosy do spotřebování výchozí látky, nebo do té doby, dokud na TLC docházelo k jakýmkoliv viditelným změnám. V případě použití chráněné ribosy v 1,5 molárním nadbytku nedošlo ani po 28 hodinách ke spotřebování veškerého výchozího purinu (cca 50 % VL bylo získáno zpět během purifikace). I když bylo možné v reakční směsi (pomocí TLC) vedle dalších pěti látek o slabých intenzitách pozorovat i jednu výraznější skvrnu (jak se později ukázalo odpovídající předpokládanému produktu), nepodařilo se tuto látku úspěšně izolovat. Po navýšení přebytku chráněné ribosy na dva ekvivalenty byl již na TLC viditelný zřetelnější úbytek výchozího purinu **9** (tentokrát nezreagovalo přibližně 30 % výchozí látky). Ze vzniklé směsi látek jsme však získali jen 12 % požadovaného produktu **17**. Výrazně odlišný výsledek pak poskytla reakce provedená se třemi ekvivalenty chráněné ribosy. TLC indikovala spotřebování výchozí látky již po 7 hodinách. Nicméně po zpracování (reakční směs byla zředěna vodou, vodná vrstva následně opakovaně extrahována ethyl-acetátem) a po přečištění surového produktu sloupcovou chromatografií jsme získali požadovaný produkt v celkovém výtěžku 13 %.

Tento nízký výtěžek mohl být dán buďto nevhodným zpracováním reakční směsi, jež měla vzhled mléčné suspenze vlivem přítomnosti chloridu cíničitého (nebo produktů jeho rozkladu vodou), což značně znesnadňovalo extrakci vodné fáze, nebo vznikajícími nečistotami v reakčních směsích, které však, vzhledem k nízkým intenzitám a těsnou blízkostí na TLC vrstvách, nebylo možné sloupcovou chromatografií rozdělit a izolovat. Předpokládáme, že by se mohlo jednat o deriváty

výchozí chráněné ribosy, která byla působením aktivátoru zpřístupněna dalším přeměnám, jako jsou cyklizační reakce či vlastní glykosylace.

Protože ale poslední reakce proběhla relativně rychle, výchozí purin byl spotřebován, na TLC vrstvách bylo viditelné nadějně množství produktu, bylo rozhodnuto dále pokračovat v optimalizaci tohoto kroku s trojnásobným nadbytkem glykosylového donoru.

Schéma 15

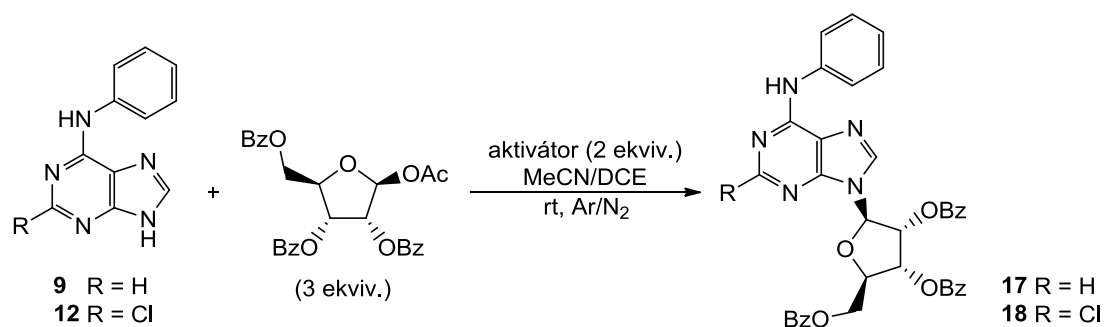


Následně tedy byla reakce purinového derivátu **9** s chloridem cíničitým a 3,0 molárními ekvivalenty chráněné ribosy provedena v jiném, pro tento typ reakcí často používaném rozpouštědle, a sice v acetonitrilu (Schéma 16, reakce 1 a 2). Zpracování reakčních směsí probíhalo stejně jako ve shora uvedených případech a bylo doprovázeno obdobnými obtížemi, v důsledku čehož se nám nepodařilo získat požadovaný produkt **17** ve výtěžku vyšším než 15 %. Tato skutečnost nás vedla ještě k otestování v literatuře objevené alternativy v podobě 1M chloridu cíničitého v dichlormethanu v kombinaci s acetonitrilem⁸⁸ (Schéma 16, reakce 3). Naneštěstí ani tato volba se neukázala jako správná, protože produkt v reakční směsi nevznikl ani po 53 hodinách.

Další glykosylace purinu **9** s třemi ekvivalenty chráněné ribofuranosy byly provedeny za katalýzy TMSOTf nejprve v dichlorethanu (Schéma 16, reakce 4), kdy byl na TLC pozorován postupný vznik produktu **17**, který se však s prodlužujícím se reakčním časem téměř ztrácel v přibývajícím množství vedlejších látek a v průběhu čištění se jej nepodařilo vůbec izolovat. Naopak při glykosylaci s TMSOTf v acetonitrilu výchozí derivát **9** ochotně zreagoval během 6 hodin a i přesto, že byla reakce opět doprovázena vznikem vedlejších produktů, se podařilo žádaný produkt **17** získat v 54% výtěžku (Schéma 16, reakce 5).

Ke glykosylaci druhé modelové sloučeniny **12** byla, na základě výše komentovaných reakcí, použita kombinace triflátu v acetonitrilu za laboratorní teploty pod inertní atmosférou. Po 5 hodinách byl veškerý výchozí purin spotřebován a po zpracování reakční směsi a následné purifikaci pomocí sloupcové chromatografie byla získána sloučenina **18** ve výtěžku 51 % (Schéma 16, reakce 6).

Schéma 16



Reakce	Výchozí látka	Aktivátor	Rozpouštědlo	Čas [h]	Produkt	Výtěžek [%]
1	9	SnCl ₄	DCE	27	17	13
2	9	SnCl ₄	MeCN	8	17	15
3	9	1M SnCl ₄ /DCM	MeCN	53	---	---
4	9	TMSOTf	DCE	44	---	---
5	9	TMSOTf	MeCN	6	17	54
6	12	TMSOTf	MeCN	5	18	51

Jak je patrné z výsledků uvedených v tabulce u Schématu 16, glykosylační reakce provedené v dichlorethanu nevedly k žádanému cíli (reakce 4), případně poskytovaly požadovaný produkt ve velmi nízkém výtěžku (reakce 2). Po bližším prostudování literatury byl vyzkoušen a pro budoucí použití upřednostněn právě acetonitril. Dichlorethan totiž podporuje spíše vznik 1,2-*cis* glykosidů (α -anomerů), zatímco polárnější acetonitril je vhodnější pro přípravě námi preferovaných 1,2-*trans* glykosidů (β -anomerů). Při oněch reakcích totiž *in situ* vytvořený acyloxoniový kation zaujímá výhradně axiální orientaci umožňující stereoselektivní formaci ekvatoriálně substituovaného glykosidu. Tento postup pak zajišťuje získání 1,2-*trans* nukleosidů s dostatečnou stereoselektivitou i u takových glykosylových donorů, které nesou neúčastníci se substituent.⁷

Po přečištění surových směsí se nepodařilo vyizolovat, vyjma požadovaného produktu nebo nezreagované výchozí chráněné ribosy a VL, žádnou z vedlejších látek vznikajících v průběhu reakce, proto nám jejich struktura zůstává neznáma. Tento fakt byl dán tím, že podle TLC představovaly vedlejší produkty řadu v praxi nedělitelných směsí.

Struktura sloučeniny **17** byla potvrzena na základě výsledků získaných pomocí běžných spektrálních metod (IR, MS a NMR).

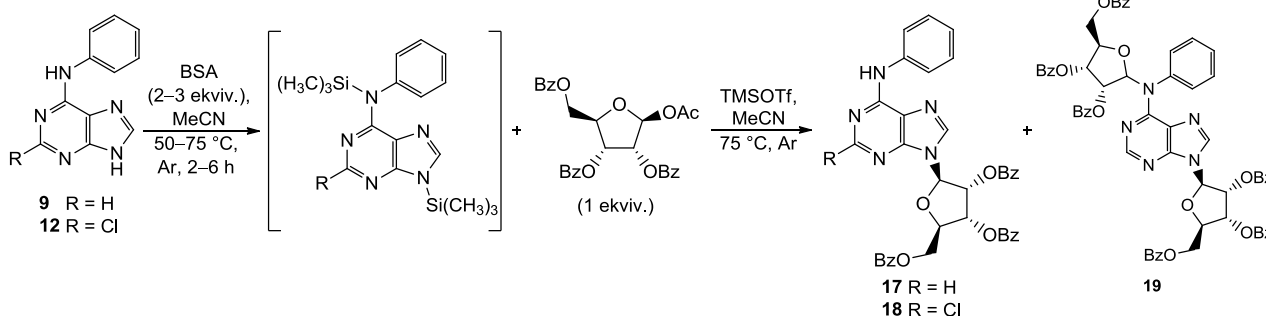
Glykosylace vedené přes silylované meziproducty

Vedle jednokrokových glykosylací s Lewisovými kyselinami jsou populární rovněž glykosylace vedené přes silylované báze, které jsou v literatuře vyzdvihovány

zejména ze tří důvodů: i) jednoduše se připravují, ii) ochotně reagují s cukry v homogenních roztocích díky zvyšující se rozpustnosti a větší nukleofilitě a iii) poskytují meziprodukty, které lze snadno převést na modifikované báze.⁸⁹ Ovšem mají nevýhodu spočívající v tom, že vyžadují práci za striktně bezvodých podmínek. Zpočátku bývaly také tyto reakce katalyzovány LK, časem však byly LK nahrazeny silylestry silných kyselin, jako je mimo jiné i TMSOTf.⁹⁰

Námi prováděná dvoukroková glykosylace se silylovým meziproduktem je uvedena na Schématu 17.²³ Bezprostředně před samotnou glykosylací byl v acetonitrilu vygenerován persilylovaný meziproduct ze sloučeniny **9** za použití silylačního činidla bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA). V acetonitrilu za běžných podmínek nerozpustná výchozí látka vytvořila nažloutlou suspenzi, která se po přidání BSA téměř ihned rozpustila. Dalo by se předpokládat, že právě rozpuštění suspenze značí úspěšnou silylaci, ale protože se silylované látky v kontaktu se vzdušnou vlhkostí okamžitě rozkládají, nebylo možné tuto hypotézu spolehlivě ověřit. Nechali jsme tedy reakci probíhat 2 hodiny při 50 °C a teprve poté bylo do reakční směsi pomocí injekční stříkačky přes septum přidáno ekvimolární množství chráněné ribofuranosy a TMSOTf. Průběh reakce byl od této chvíle sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie, přičemž reakce byla ukončena po 19 hodinách, kdy na TLC nebyla viditelná výchozí látka (Schéma 17, reakce 1).

Schéma 17



Reakce	Vých. látka	BSA [ekviv.]	Silylace		Ribosa [ekviv.]	Čas [h]	Produkt	Výtěžek [%]
			Teplota [°C]	Čas [h]				
1	9	2,0	50	2	1,0	19	17 19	18 19
2	9	2,0	75	6	1,0	17	17 19	31 12
3	9	2,0	75	6	2,0	24	17 19	17 54
4	9	3,0	75	6	2,0	3	17 19	20 50
5	12	2,0	75	6	1,0	7	18	97

Po zpracování a přečištění surové reakční směsi byla uvažovaná sloučenina **17** získána v relativně nízkém výtěžku 18 %. Paralelně s tím byla, ve výtěžku 19 %, izolována sloučenina, jejíž struktura nám byla po určitou dobu neznáma. Na základě NMR a MS analýz bylo navrženo, že se jedná o látku **19**, jež je substituována dvěma

cukernými zbytky, jedním v poloze 9 purinového skeletu a druhým velmi pravděpodobně na atomu dusíku v poloze C6 purinového kruhu.

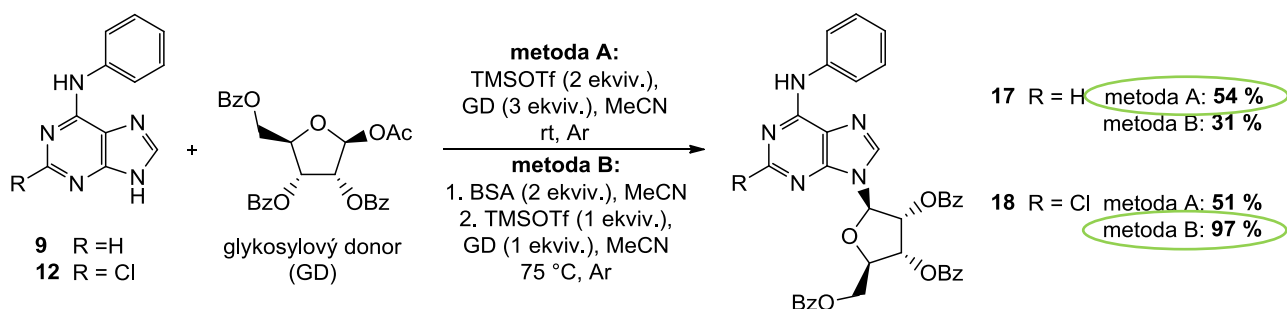
Ve Schématu 17 jsou uvedeny výsledky experimentů, které byly provedeny s cílem zvýšit výtěžek požadovaného produktu **17**. Oproti prvnímu pokusu byla zvýšena teplota až k bodu varu acetonitrilu a doba silylace (1. krok) prodloužena na 6 hodin. Na základě předpokladu, že výchozí purin **9** bude po uvedené době již dostatečně silylován, bylo přidáno opět po jednom ekvivalentu ribosy a triflátu. Po 17 hodinách, kdy byla reakce ukončena, izolovaný výtěžek sloučeniny **17** skutečně vzrostl, a to na 31 %. Vzniklé množství sloučeniny **19** pokleslo a činilo jen 12 % (Schéma 17, reakce 2). Přesto nebyl výsledek tohoto experimentu uspokojivý, aby mohly být uvedené reakční podmínky použity pro přípravu dalších nukleosidů.

Z toho důvodu jsme přistoupili k otestování následujících dvou modifikací. V případě reakce označené ve Schématu 17 číslem 3 byl ve druhém kroku vložen dvojnásobný molární přebytek ribofuranosy. I když jsme počítali s tím, že vedlejší produkt bude vznikat ve větší míře, předpokládali jsme však, že rychleji bude vznikat požadovaná sloučenina **17** a k substituci na atomu dusíku v poloze 6 dojde až po obsazení polohy 9. Tento předpoklad se ovšem nepotvrdil. Látka **19** byla izolována ve výtěžku 54 %, zatímco výtěžek sloučeniny **17** činil pouhých 17 %. Ke zlepšení nevedla ani druhá zmíněná modifikace, a sice použití silylačního činidla BSA v třímolárním přebytku. Konečný výsledek této reakce (Schéma 17, reakce 4) se takřka shodoval s předcházejícím pokusem. Silylace výchozích látek je tudíž dostatečná a přidavek silylačního činidla výtěžek neovlivnil.

Pro srovnání jsme touto metodou provedli i glykosylaci purinu **12** za reakčních podmínek uvedených ve Schématu 17, reakce 2. Sloučenina **18** byla úspěšně vyizolována po sedmihodinové glykosylaci persilylovaného purinu v překvapivě vysokém výtěžku 97 %. Dle TLC došlo k úplnému zreagování výchozího purinu, jakož i do reakce vstupující chráněné ribofuranosy, a to bez prokazatelného vzniku vedlejších produktů.

Pro lepší přehlednost a snadnější orientaci je na Schématu 18 uvedeno srovnání nejslibněji se jevících glykosylací pro přípravu budoucích adamantylovaných nukleosidů. Pro glykosylaci sloučenin s atomem vodíku v poloze 2 purinového skeletu (dále označovaná jako „H-řada“) byla vybrána jedнокroková Hilbertova–Johnsonova glykosylace, zatímco pro přípravu nukleosidů s atomem chloru v poloze 2 („Cl-řada“) se jako vhodnější jevila dvoukroková Vorbrüggenova glykosylace se silylovanými meziprodukty.

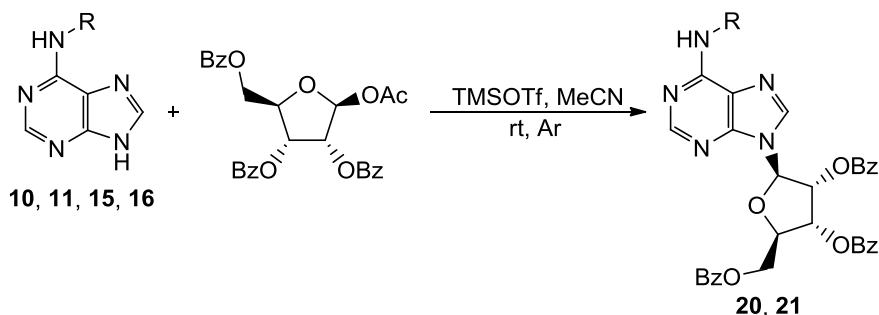
Schéma 18



Glykosylace purinů substituovaných 1-adamantylem – „H-řada“

Sloučeniny **10** a **11** byly pak úspěšně glykosylovány pomocí jedнокrokové Hilbertovy–Johnsonovy metody (Schéma 19), tzn. za použití TMSOTf jako aktivátoru a 3,0 ekviv. chráněné ribofuranosy v acetonitrilu za laboratorní teploty pod argonovou ochrannou atmosférou. V případě syntézy sloučeniny **20** došlo ke spotřebování výchozí látky již po 3 hodinách a požadovaný produkt se podařilo úspěšně vyizolovat v 73% výtěžku. Chráněný nukleosid **21** vznikal jednou tak dlouho, reakce byla ukončena až po 6 hodinách s konečným výtěžkem 59 %. Obě sloučeniny byly charakterizovány obvyklými spektrálními metodami a získány v čistotě vhodné pro jejich použití v dalších uvažovaných reakcích.

Schéma 19



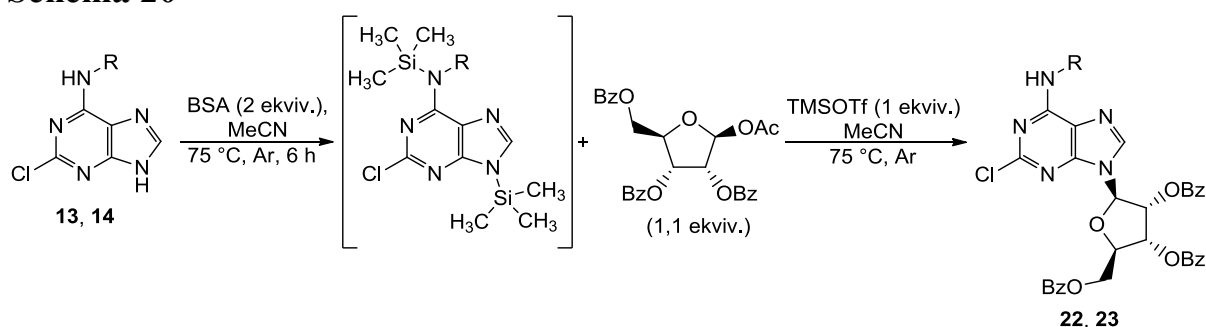
Reakce	Výchozí sloučenina	R	Reakční doba [h]	Produkt	Výtěžek [%]
1	10		3	20	73
2	11		6	21	59
3	15		8	---	---
4	16		8	---	---

Stejné reakční podmínky byly aplikovány i pro glykosylaci látek **15** a **16** (Schéma 19, reakce 3 a 4), k přípravě uvažovaných sloučenin ovšem nevedly. Dle TLC došlo po 8 hodinách téměř ke kompletnímu zreagování výchozích sloučenin, z obou reakcí však byly obdrženy velmi komplikované a nepurifikovatelné směsi látek. Pravděpodobně díky přítomnosti dalšího reaktivního centra v podobě hydroxylové skupiny mezi benzenovým jádrem a 1-adamantylem docházelo k nežádoucím reakcím ve větší míře, než jsme původně předpokládali. Z tohoto důvodu bylo upuštěno od dalších experimentů, aby nedocházelo k plýtvání výchozími látkami, a redukce byla opětovně posunuta a naplánována až po odstranění chránících skupin z cukerné části.

Glykosylace purinů substituovaných 1-adamantylem – „Cl-řada“

Glykosylace purinových derivátů **13** a **14** byla provedena Vorbrügenovou dvoukrokovou metodou, a to se stejně dobrými výsledky, jako tomu bylo u modelové sloučeniny **12**. Nutno podotknout, že podmínky provádění reakce bylo zapotřebí nepatrně modifikovat. Byl-li použit shodný postup jako v případě syntézy sloučeniny **12**, (2,0 ekviv. BSA v 1. kroku; 1,0 ekviv. chráněného cukru a 1,0 ekviv. triflátu ve 2. kroku), bylo na TLC zjevné spotřebování veškeré ribofuranosy, zatímco výchozí puriny byly stále ještě, i když v nevelkém množství, v reakční směsi přítomny. Proto jsme do dalších reakcí mírně navýšili přebytek chráněné ribofuranosy na 1,1 ekvivalentu (Schéma 20). Obě výchozí sloučeniny pak zcela zreagovaly a reakční směsi obsahovaly vedle samotných produktů jen velmi malé množství nečistot, které se daly bez větších obtíží odstranit pomocí sloupcové chromatografie. Izolované výtěžky chráněných nukleosidů **22** a **23** pak činily 89 % a 81 %.

Schéma 20



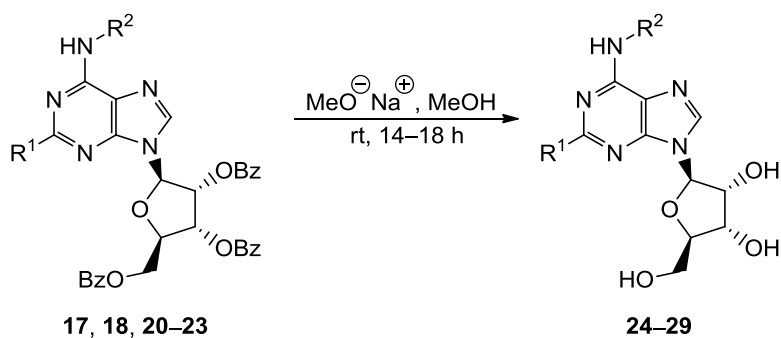
Výchozí sloučenina	R	Reakční doba [h]	Produkt	Výtěžek [%]
13		2	22	89
14		4	23	81

6.3 Odchránění prekurzorů nukleosidů

Poslední krok nutný k získání uvažovaných nukleosidů spočíval v odstranění benzoylových chránících skupin z ribofuranosových hydroxylových skupin dosud připravených prekurzorů. Ze spousty v literatuře popsanych metod sloužících k odchránění byl vybrán nenáročný a efektivní postup využívající účinku methoxidu sodného.^{28,91,92}

Benzoylové chránící skupiny byly nejprve odstraněny z prekurzorů „modelových“ nukleosidů **17** a **18**, a to působením 1M methoxidu sodného v methanolu, přes noc, za laboratorní teploty (Schéma 21, reakce 1 a 4). Po ukončení reakcí bylo z reakčních směsí za vakua odpařeno rozpouštědlo a získané surové produkty byly následně dočištěny pomocí sloupcové chromatografie. Nukleosidy **24** a **27** byly získány ve vysokých výtěžcích 77 % a 95 %. Odchránění zbývajících nukleosidů **20**, **21**, **22** a **23**, obsahujících ve své molekule adamantanový motiv, proběhlo rovněž bez problémů, kdy uvažované sloučeniny byly získány ve výborných výtěžcích pohybujících se v rozmezí 87–94 % (Schéma 21, reakce 2, 3, 5 a 6).

Schéma 21



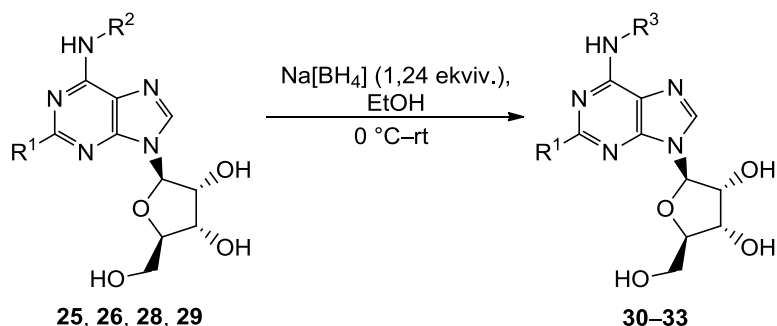
Reakce	Výchozí sloučenina	R ¹	R ²	Reakční doba [h]	Produkt	Výtěžek [%]
1	17	H		17	24	77
2	20	H		18	25	92
3	21	H		17	26	94
4	18	Cl		14	27	95
5	22	Cl		16	28	90
6	23	Cl		16	29	87

6.4 Redukce karbonylové skupiny sloučenin 25, 26, 28 a 29

Z důvodů popsaných v kapitole 6.2.3 (str. 35) byla redukce karbonylové skupiny zařazena až téměř na konec celé syntetické cesty a týkala se již hotových ochráněných nukleosidů **25**, **26**, **28** a **29**, které jsme chtěli převést na odpovídající alkoholy.⁸⁰

Karbonylová skupina byla u těchto sloučenin zredukována stejným způsobem jako v případě purinových derivátů **10** a **11**, kdy byly připraveny látky **15** a **16** (kap. 6.2.2, str. 28), a sice tetrahydridoboritanem sodným, jenž byl do suspenze dané výchozí látky v ethanolu přidán při 0 °C. Samotná reakce probíhala po vytemperování reakční směsi na laboratorní teplotu přibližně 24 hodin a výtěžky všech izolovaných produktů, po přečištění surových směsí sloupcovou chromatografií, se pohybovaly v rozmezí 80–90 % (Schéma 22, reakce 1–4).

Schéma 22



Reakce	Výchozí sloučenina	R ¹	R ²	Reakční doba [h]	Produkt	R ³	Výtěžek [%]
1	25	H		25	30		82
2	26	H		24	31		90
3	28	Cl		24	32		86
4	29	Cl		23	33		80

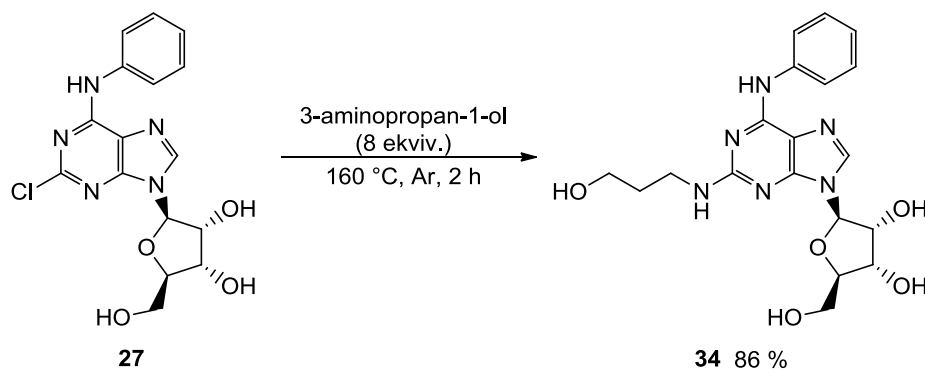
6.5 Nukleofilní aromtická substituce atomu Cl v poloze C2

V závěrečném kroku měly být připraveny 2,6-diaminonukleosidy zavedením zbytku z 3-aminopropan-1-olu do polohy C2 purinového kruhu dosud stále obsazené atomem chloru u nukleosidů **27–29**, **32** a **33**. I v tomto případě byly reakční podmínky nejprve otestovány, a sice na nukleosidu **27**.

Už po 2 hodinách v osmimolárním přebytku 3-aminopropan-1-olu při teplotě 160 °C a pod ochrannou argonovou atmosférou indikovala TLC spotřebování výchozího nukleosidu (Schéma 23). Po zpracování reakční směsi jejím zředěním

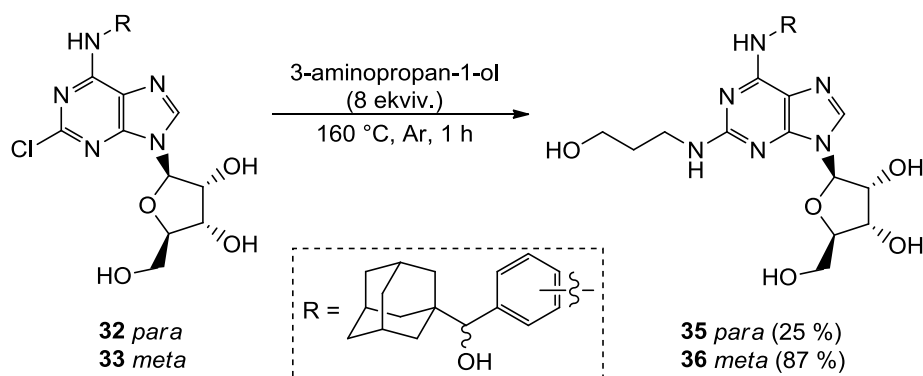
chloroformem se stopovým množstvím methanolu a několikerým promytím destilovanou vodou za účelem odstranění nezreagovaného 3-aminopropan-1-olu, bylo po odpaření organického rozpouštědla a přečištění sloupcovou chromatografií úspěšně izolováno 86 % požadovaného produktu, jehož struktura byla ověřena pomocí obvyklých spektrálních metod.

Schéma 23



Reakční postup byl následně aplikován i na nukleosidy **32** a **33**, které mezi benzenovým jádrem a 1-adamantylem nesly hydroxylovou skupinu. Stejně jako v předešlém případě došlo, dle TLC, ke spotřebování výchozích látek již po 60 minutách (Schéma 24). Po zpracování obou reakčních směsí a odpaření chloroformu však byla získaná množství surových produktů velmi nízká, z čehož jsme usoudili, že látky by mohly i nadále zůstat ve vodném podílu. Obě vodné fáze byly proto okyseleny několika kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové a znovu extrahovány chloroformem. Zatímco sloučeninu **36** se podařilo získat v izolovaném výtěžku 87 %, u sloučeniny **35** jsme tak úspěšní nebyli, a to i přesto, že byla provedena opakovaná extrakce vodných podílů pomocí ethyl-acetátu, coby polárnějšího rozpouštědla. Konečný výtěžek sloučeniny **35** tak činil pouhých 25 %.

Schéma 24

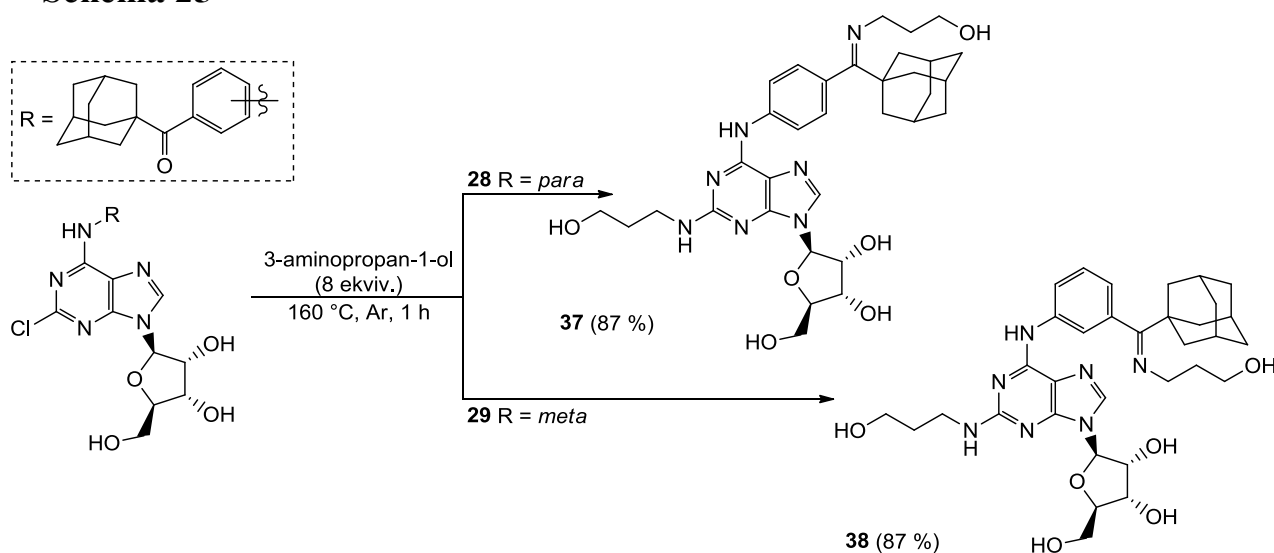


V případě zbývajících dvou nukleosidů **28** a **29** obsahujících ve své struktuře 1-adamantyl(fenyl)keton neproběhly substituce zcela dle očekávání (Schéma 25). Přestože v jejich průběhu byly na TLC viditelné jen mizející výchozí látky a vznikající produkty, po zpracování se ukázalo, že surové produkty obsahují celkem

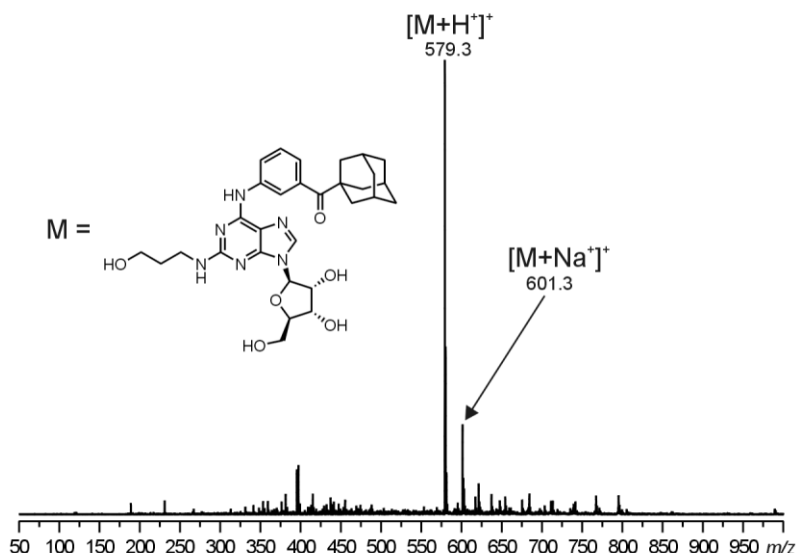
dvě látky o výrazně různých intenzitách a s velmi podobnými retenčními faktory. Vzhledem k tomu, že obou látek bylo na počátku reakcí velmi malé množství, nebylo jejich dělení na sloupcové chromatografii vůbec jednoduché, přesto se po několikátém zopakování podařilo z každé směsi izolovat po jednom produktu.

Původní studie⁹³ se zmiňuje, že u podobných sloučenin docházelo při tomto typu reakcí ke vzniku nežádoucích látek, pravděpodobně iminů, které se ale nepodařilo izolovat a patřičně charakterizovat. Díky jejich navrženému mechanismu a následnému vlastnímu ověření struktur obdržných sloučenin pomocí NMR byla hypotéza o vzniku iminů v obou reakcích přeci jen podpořena (¹H NMR spektra potvrdila přítomnost dvou uhlovodíkových řetězců se 6 atomy vodíků a dvou nových protonů z hydroxylových skupin) a dvě získané sloučeniny byly identifikovány jako iminy **37** a **38**.

Schéma 25

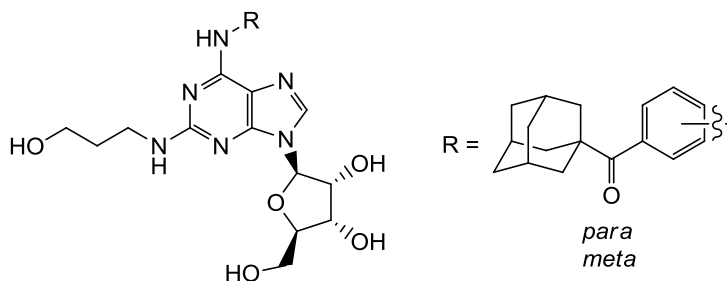


Že ale nejde o nutně konečnou podobu látek, nám odhalil výsledek z hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). Ve spektru prvního řádu nukleosidu **38** (Obrázek 14) byl v pozitivním skenovacím módu pozorovaný dominantní signál o m/z 579, který však neodpovídal hmotnosti obdržného iminu.



Obrázek 14: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **38**.

Po krátké úvaze jsme došli k závěru, že se jednalo o protonovaný molekulový ion původně požadované sloučeniny (Obrázek 15), jejíž exaktní hmotnost činí 578,285 u. Pravděpodobně během přípravy vzorků látek **37** a **38** pro potřeby ESI-MS analýzy došlo vlivem jejich rozpouštění a ředění ve směsi MeOH:H₂O (1:1, v:v) k hydrolyze iminové skupiny zpět na oxoskupinu. Tento předpoklad však nebylo v našich silách experimentálně ověřit, a to z důvodu nedostatečného množství potřebných sloučenin. Ve spektru je rovněž viditelný signál o *m/z* 601 odpovídající sodnému aduktu původně požadovaného nukleosidu.

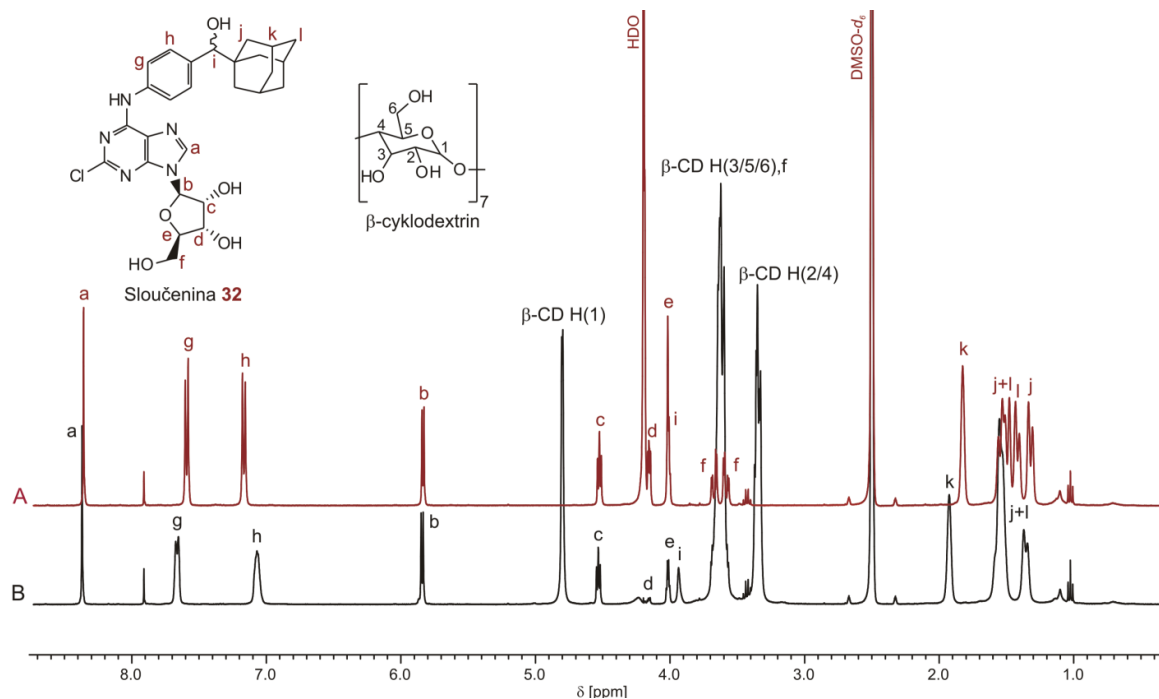


Obrázek 15: Očekávané produkty z reakce uvedené na Schématu 25.

7 STUDIUM TVORBY HOSTITEL–HOST KOMPLEXŮ S β -CD

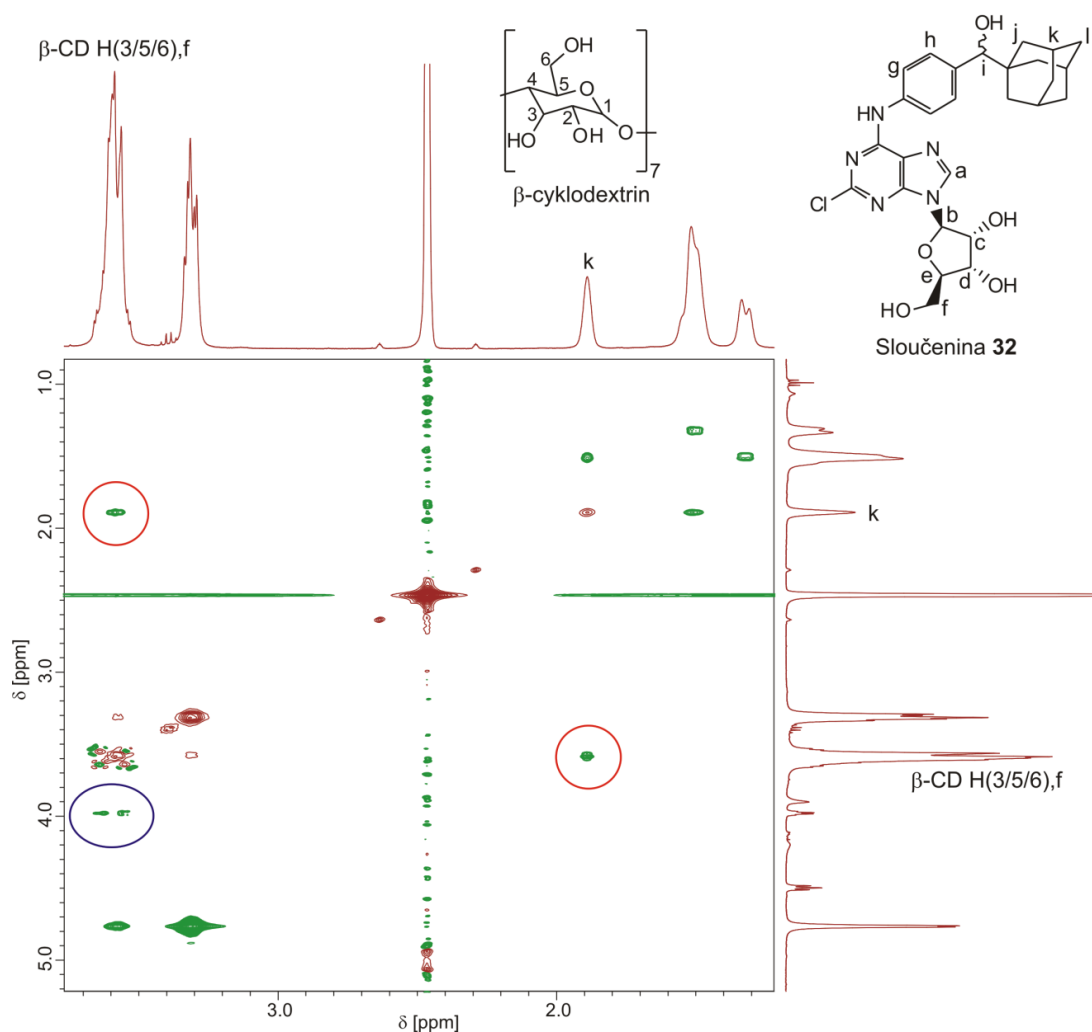
V návaznosti na výsledky nedávno publikované naší výzkumnou skupinou⁸² byla u připravených nukleosidů cíleně studována jejich schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s β -cyklodextrinem (β -CD). Podnětem pro tento počín bylo zlepšení farmakokinetických a farmakodynamických vlastností komplexovaných sloučenin pro jejich snadnější pohyb v biologickém prostředí. Cyklodextriny (CDs) se k tomuto účelu využívají zcela běžně.

Pro demonstraci schopnosti připravených sloučenin tvořit inkluzní komplexy s β -CD byl zvolen nukleosid **32**. Na Obrázku 16 jsou uvedena dvě ^1H NMR spektra, měřená ve směsi $\text{DMSO-}d_6$: D_2O (2:1, v:v) při 303 K, 400 MHz, a to samotné sloučeniny **32** (linie A) a po přidavku přibližně 1,2 molárního ekvivalentu β -CD (linie B). Přítomnost předpokládaného komplexu nukleosidu **32** s β -CD naznačuje výrazná změna chemického posunu, která je patrná zejména u signálů náležících atomům vodíku z adamantanové klece (**j**, **l**, **k**). Všechny tyto signály změnily polohu směrem k vyšším hodnotám chemického posunu, což je typické pro adamantanový skelet (či jiné klecové uhlovodíky) nacházející se uvnitř dutiny β -CD. Přítomnost β -CD také ovlivňuje chemický posun aromatických signálů benzenového jádra a signálu skupiny CHOH spojující adamantanovou klec s benzenovým jádrem. Signál **g** se posunul k vyšším a signály **h** a **i** k nižším hodnotám chemického posunu. Naproti tomu chemické posuny signálů purinu a ribosy nebyly přidáním β -CD nijak ovlivněny, což rovněž naznačuje vznik supramolekulárního komplexu s adamantanovým substituentem v kavitě β -CD.



Obrázek 16: ^1H NMR spektrum sloučeniny **32** (A) a komplexu **32** s β -CD (B), spektrum B bylo získáno za využití presaturace signálu HDO.

Hypotézu, že se adamantan nachází uvnitř kavity β -CD, může podpořit i výsledek HH-ROESY experimentu, který dokáže identifikovat prostorově blízká jádra do vzdálenosti přibližně 6Å. Ve výřezu 2D NMR spektra (Obrázek 17) lze pozorovat intermolekulární interakce mezi atomy vodíku ze skupin CH adamantanového skeletu (signál **k**) a vnitřními atomy vodíku z β -CD, H(3/5/6), které ovšem nejsou ve spektru rozlišeny (vyznačeno v Obrázku 45 červenou barvou). Dále pak je ve spektru viditelná korelace fenylového atomu vodíku **g** rovněž s H(3/5/6) β -CD. Signály vnitřních H-atomů kavity β -CD, H(3/5/6), ovšem překrývají dva dublety dubletů (dd) náležející **f** atomům ribosy. Případná záměna intermolekulárních kontaktů s protony β -CD s intramolekulárními kontakty s atomy vodíku na ribose je ale velmi nepravděpodobná. Dle modelu sloučeniny **32** optimalizovaného pomocí MM2 (molekulová mechanika 2) činí vzdálenost mezi atomy **f** a **k** minimálně 10 Å. Navíc tvar cross-signálu neodpovídá charakteristickému tvaru pro dva dd, jak je možné srovnat s intramolekulárním cross-signálem mezi atomy ribosy **f** a **e** (ve spektru vyznačeno modrou barvou).



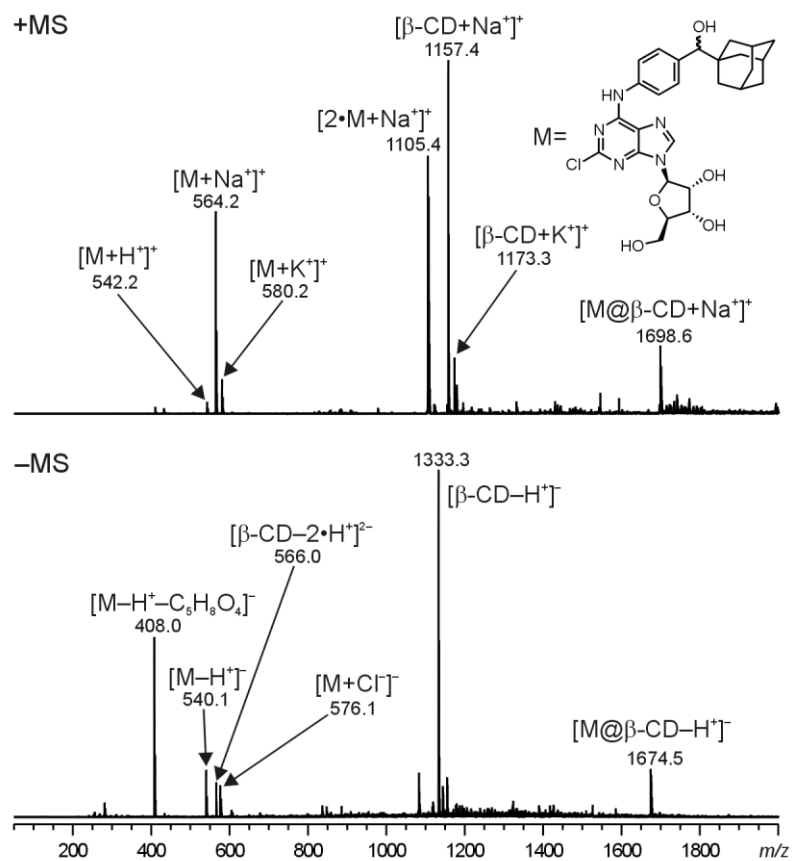
Obrázek 17: Výřez ROESY spektra směsi látky **32** s β -CD. Měřeno v $\text{DMSO-}d_6\text{:D}_2\text{O}$ (2:1, v:v) při 303 K, 400 MHz s použitím presaturace signálu HDO.

Kromě nukleární magnetické rezonance (prováděné v roztoku) byla schopnost nukleosidů **24–33** vytvářet supramolekulární komplexy s β -CD ověřena také v plynné fázi, konkrétně za použití hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Analyzovány byly ekvimolární směsi příslušného purinu a β -CD, kdy roztoky byly připravovány bezprostředně před realizací samotné analýzy. Cílem bylo zjistit, zda příslušné hostitel–host komplexy vznikají a pokud ano, jaká je jejich stechiometrie. V případě tvorby komplexů pak byla ověřena jejich stabilita, což bylo realizováno pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie za podmínek kolizně indukované disociace. Jednotlivé směsi byly analyzovány jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu.

Ve spektrech prvního řádu získaných v kladném skenovacím módu byly pozorovány tři „série“ iontů. Ionty pocházející z molekuly hosta, ionty pocházející z molekuly hostitele a ionty, jejichž hodnota m/z odpovídala tvorbě komplexu typu hostitel–host. Hostující molekula byla zastoupena celkem čtyřmi ionty, jejichž hodnota m/z odpovídala protonované molekule ($[M+H]^+$), sodnému ($[M+Na]^+$) a draselnému ($[M+K]^+$) aduktu. Tyto ionty byly doprovázeny jedenkrát nabitým signálem, jehož hodnota m/z byla přibližně dvakrát vyšší, a který byl určen jako sodný adukt dimeru molekuly hosta ($[2\cdot M+Na]^+$). Ionty pocházející z hostitelské molekuly měly hodnotu m/z 1157 a 1173 a byly identifikovány jako sodný a draselný adukt β -CD. Posledním pozorovaným ve spektru byl jedenkrát nabitý ion, jehož hodnota m/z odpovídala sodnému aduktu komplexu tvořeného jednou molekulou hosta a jednou molekulou hostitele ($[M@\beta\text{-CD}+Na]^+$). Bohužel se v žádném z analyzovaných vzorků nepodařilo úspěšně provést izolaci a následnou fragmentaci tohoto iontu a není tak možné detailněji diskutovat o jeho chování v plynné fázi.

V případě záporné ionizace byly opět pozorovány tři „série“ signálů, které stejně jako ve výše uvedeném případě pocházely z molekuly hosta, hostitele a komplexu. Molekula hosta byla zastoupena třemi jedenkrát nabitými ionty, které byly určeny jako deprotonovaný ion molekuly nukleosidu **32** ($[M-H]^-$), chloridový adukt molekuly ($[M+Cl]^-$) a deprotonovaný ion hosta postrádající cukernou jednotku ($[M-H^+-C_5H_8O_4]^-$). Struktura tohoto iontu byla navržena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) iontu odpovídajícího deprotonované molekule, během níž tento ion vznikal. Můžeme tedy říci, že se jedná o produkt fragmentace v iontovém zdroji, což není v případě měkkých ionizačních technik (mezi něž se ESI počítá) děj úplně obvyklý. Hostitelská molekula byla zastoupena dvěma ionty, jedenkrát nabitým iontem o m/z 1133 ($[\beta\text{-CD}-H]^+$) a dvakrát nabitým iontem o m/z 566 odpovídajícím molekule β -CD bez dvou atomů vodíku ($[\beta\text{-CD}-2\cdot H]^2+$). Posledním pozorovaným byl ion, jehož hodnota m/z odpovídala deprotonovanému komplexu daného purinu a β -CD ($[M@\beta\text{-CD}-H]^+$).

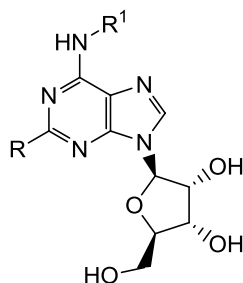
Ilustrativní ESI-MS spektra směsi nukleosidu **32** s β -CD jsou znázorněna na Obrázku 18.



Obrázek 18: ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi sloučeniny 32 a β -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.

8 STUDIUM BIOLOGICKÉ AKTIVITY PURINOVÝCH NUKLEOSIDŮ

Biologická aktivita připravených látek byla testována ve spolupráci s Katedrou experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D. Konkrétně byly zkoumány purinové ribonukleosidy **24–33** (Obrázek 19). Testování bylo provedeno ve dvou úrovních. Jednak byl studován antiproliferační účinek sloučenin proti dvěma typům lidského hematologického nádorového onemocnění, a to vůči chronické myeloidní leukémii (K562) a akutní myeloidní leukémii (MV4;11). Následně bylo provedeno i testování na rostlinných systémech – schopnost inhibice enzymu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (CKX). Biologická odezva byla zjišťována jak u samotných nukleosidů, tak u jejich ekvimolárních směsí s β -CD.



Obrázek 19: Obecná struktura testovaných sloučenin.

8.1 Cytotoxicita

Výsledky testování antiproliferační aktivity jsou shrnuty v Tabulce 3 v hodnotách IC_{50} , kdy při této koncentraci dochází k 50% inhibici růstu nebo aktivity nádorových buněk. Implementací cukerného zbytku do polohy 9 purinového skeletu nesoucího 1-adamantylované substituenty se skutečně, v souladu s naším předpokladem, zlepšila do jisté míry rozpustnost připravených nukleosidů v polárním prostředí. Na druhou stranu komplexace testovaných látek s β -CD jejich biologický účinek nijak výrazně neovlivnila.

V případě antiproliferační aktivity vůči nádorové linii K562 nebyla zjištěna žádná odezva u sloučenin **24–27**, **29–31** a **33**. Jistá cytotoxicita, jejíž hodnoty se pohybovaly těsně pod hranicí maximální testovné koncentrace, byla potvrzena pouze u sloučenin **28** a **32**, obě s *para* adamantylovým substituentem v poloze C6 a atomem chloru v poloze C2. Výsledky testování proti druhému biologickému cíli, MV4;11, byly o něco pozitivnější. Nejvýraznější antiproliferační účinek, 12,3 μ M, byl prokázán u nukleosidu **32**, jenž má v poloze C6 *para* adamantylový substituent s karbonylovou skupinou mezi adamantylem a benzenovým kruhem a v poloze C2 atom chloru. Druhou nejvyšší hodnotu vykazoval právě nukleosid **28**, s hydroxylovou skupinou mezi benzenovým jádrem a adamantylem na substituentu v C6 a atomem chloru v poloze C2, a sice 16,6 μ M. Dále proti této linii aktivně účinkovaly také sloučeniny **26** a **29–31**.

Tabulka 2: Antiproliferační aktivita nukleosidů **24–33** proti vybraným nádorovým liniím.

Sloučenina	R	R ¹	IC ₅₀ [μM]	
			K562	MV4;11
24 β-CD·24	H		>25	>25
25 β-CD·25	H		>25	>25
26 β-CD·26	H		>25	21,8 ± 5,6
27 β-CD·27	Cl		>25	24,6 ± 0,7
28 β-CD·28	Cl		21,4 ± 2,3	>25
29 β-CD·29	Cl		22,7 ± 3,2	23,8 ± 1,7
30 β-CD·30	H		>25	24,1 ± 1,3
31 β-CD·31	H		>25	20,0 ± 7,1
32 β-CD·32	Cl		>25	24,4 ± 0,9
33 β-CD·33	Cl		23,4 ± 0,4	18,8 ± 8,8
			24,4 ± 0,8	25,0 ± 0,0
			24,4 ± 0,8	12,3 ± 3,9
			>25	18,5 ± 7,8
			>25	>25
			>25	>25

Pozn.: zkratky použitých buněčných linií K562 – chronická myeloidní leukemie, MV4;11 – akutní myeloidní leukemie; >25 = 25 μM – nejvyšší použitá koncentrace


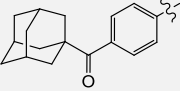
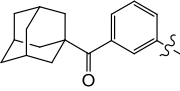

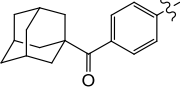
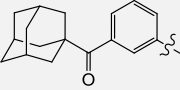
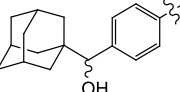
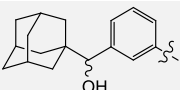
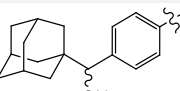
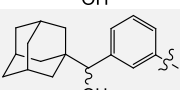
Získané hodnoty jsou bohužel mnohem vyšší než u „aromatických“ cytokininových ribosidů, u nichž byla rovněž testována antiproliferační aktivita vůči nádorovým liniím způsobujícím onemocnění krvinek.⁶⁸ Zejména vedle nejúčinnějších ribosylových forem cytokininů *o*-topolinu (*o*TR) a *N*6-benzyladeninu (BAR), je rozdíl celkem markantní. Hodnota IC₅₀ *o*TR proti buňkám K562 činí 2,40 μM, u BAR je o něco vyšší, 5,90 μM. Přestože přímo vůči nádorové linii MV4;11 tyto sloučeniny testovány nebyly, vykazují velmi výraznou aktivitu vůči buňkám promyelocytární leukemie (HL60) s IC₅₀ do 1 μM (Tabulka 1, str. 19).

8.2 Inhibice enzymu CKX

U jednotlivých nukleosidů byla rovněž testována jejich interakce s klíčovým enzymem katabolismu cytokininů, a to s cytokinin oxidasou/dehydrogenasou (CKX),

konkrétně pak s genem AtCKX2, kódujícím jednu z isoformů *Arabidopsis thaliana*. Jedná se o skupinu enzymů, která katalyzuje nevratnou degradaci cytokininů v jediném enzymatickém kroku oxidativním štěpením postranního řetězce za účelem udržení homeostázy cytokininů v organismu.^{94,95}

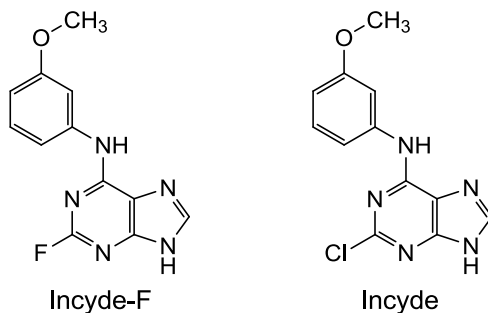
Tabulka 3: Inhibiční aktivita nukleosidů **24–33** proti CKX, doplněná o rychlost odezvy enzymu při různých koncentracích.

Sloučenina	R	R ¹	IC ₅₀ [μM]	Maximální rychlost enzymu [%]			
				100 μM	10 μM	1 μM	0,1 μM
24 β-CD· 24	H		4,41·10 ³	71,85±5,91	82,58±6,33	86,19±8,23	88,59±6,59
			3,51·10 ³	72,33±4,65	85,73±7,04	90,36±5,39	91,55±7,03
25 β-CD· 25	H		1,34·10 ⁵	98,99±8,75	84,39±7,74	85,97±7,72	88,95±8,27
			9,68·10 ⁵	93,44±5,98	91,14±6,01	90,11±6,45	91,84±5,43
26 β-CD· 26	H		6,77·10 ⁴	93,43±6,72	83,57±8,80	86,18±5,96	87,81±9,24
			4,61·10 ⁴	87,11±5,87	90,47±6,75	90,74±5,21	86,62±4,49
27 β-CD· 27	Cl		1,96·10 ²	56,91±5,65	85,39±6,76	91,28±6,16	92,86±9,13
			2,01·10 ²	57,43±4,40	85,22±5,97	92,93±4,49	91,34±5,77
28 β-CD· 28	Cl		8,58·10 ⁴	93,50±10,76	87,77±8,20	87,81±9,87	86,69±6,16
			7,21·10 ⁴	92,50±6,66	86,84±6,10	92,12±9,74	92,42±6,33
29 β-CD· 29	Cl		5,01·10 ⁴	89,44±6,60	86,59±8,42	85,88±6,78	86,41±7,79
			6,66·10 ⁴	90,22±6,91	91,14±5,41	90,09±4,71	89,12±10,05
30 β-CD· 30	H		4,02·10 ⁴	87,89±13,04	85,32±6,81	87,72±7,37	87,12±6,70
			4,37·10 ⁴	87,22±9,78	89,79±4,85	90,65±4,99	88,97±4,81
31 β-CD· 31	H		1,62·10 ⁵	97,83±7,19	90,21±6,84	87,39±8,16	89,85±6,15
			1,89·10 ⁴	82,40±9,11	92,87±4,79	91,41±4,39	93,69±7,17
32 β-CD· 32	Cl		3,76·10 ⁴	87,20±7,49	85,82±7,79	87,56±5,67	88,06±5,93
			4,48·10 ⁴	87,11±4,66	91,70±7,60	89,52±5,26	90,50±4,38
33 β-CD· 33	Cl		1,02·10 ⁵	95,09±8,58	87,69±6,49	87,10±5,89	89,21±5,92
			4,11·10 ⁴	87,37±5,89	94,61±5,98	93,30±5,36	92,84±6,63
Incyde-F	---	---	6,42·10 ⁻²	1,0±6,71	9,87±8,01	39,71±9,77	84,02±9,89
β-CD·Incyde-F	---	---	5,18·10 ⁻²	0,33±4,74	8,14±5,68	36,72±8,33	79,58±9,42

Testování vůči enzymu AtCKX2 bohužel neodhalilo žádné nové skutečně účinné inhibitory (Tabulka 3). V porovnání se standardem Incyde-F (Obrázek 20), jehož IC₅₀ činí 0,06 μM (resp. 0,05 μM v komplexu s β-CD), je aktivita našich testovaných purinových nukleosidů velmi nízká. Jako nejméně aktivní se ukázala modelová sloučenina **27** substituovaná v poloze C6 fenylovým zbytkem a atomem chloru v poloze C2 s hodnotou IC₅₀ = 196 μM, což odpovídá o tři řády nižšímu účinku, než je právě účinek zmíněného standardu. Z adamantylovaných nukleosidů pak vykazuje

nejvyšší účinnost sloučenina **31** v komplexu s β -CD, $189 \cdot 10^2 \mu\text{M}$. V několika případech mělo ředění látek s cyklodextrinem na jejich testovanou aktivitu pozitivní vliv a účinek posilovalo.

Po srovnání s daty v dostupné literatuře činil druhý nejsilnější inhibiční účinek vůči CKX ještě analog standardu, rovněž na Obrázku 20, a to $1,9 \mu\text{M}$, který v poloze C2 purinového skeletu obsahuje atom chloru.^{96,97}



Obrázek 20: Inhibitory enzymu CKX.

ZÁVĚR

Cílem předložené disertační práce bylo připravit sérii nových 6-substituovaných a 2,6-disubstituovaných purinových ribonukleosidů a provést jejich biologický screening.

Navržená multikroková syntéza, která byla úspěšně vyzkoušena a optimalizována během přípravy „modelových“ nukleosidů **24** a **27**, se ukázala být efektivní, účinná a dobře reprodukovatelná. Byly předpřipraveny základní komponenty v podobě substituentů pro obsazení polohy C6 (sada 1-adamantyl(fenyl)aminů) a výchozí látka pro řadu nukleosidů s atomem vodíku v poloze C2 purinového kruhu (6-chlor-9H-purin). Po několika neúspěšných pokusech o syntézu guaninu, určeného coby výchozí sloučenina pro druhou řadu nukleosidů s primární aminoskupinou v poloze C2 purinu, byl použit 2,6-dichlor-9H-purin již dříve zakoupený z komerčních zdrojů. Po substituci atomu chloru v poloze C6 obou výchozích purinů připravenými primárními aminy byla dalším krokem glykosylace získaných purinových derivátů, tedy implementace chráněného ribofuranosylu do polohy N9 purinového kruhu. Glykosylace byla provedena dvěma způsoby v závislosti na obsazenosti polohy C2: pro „řadu H“ byla zvolena jednokroková Hilbertova–Johnsonova glykosylace a pro „řadu Cl“ Vorbrüggenova glykosylace se silylovanými meziprodukty. Poslední krok k hotovým nukleosidům spočíval v odstranění chránících skupin z cukerného zbytku. Tato syntetická cesta byla pak doplněna dalšími modifikacemi purinové části zahrnujícími redukcí karbonylové skupiny u sloučenin **25**, **26**, **28** a **29** a nukleofilní substituci atomu chloru 3-aminopropan-1-olem v poloze C2 u nukleosidů **27–29**, **32** a **33**. Struktura všech získaných sloučenin byla navržena na základě výsledků získaných pomocí běžných spektrálních metod.

Připravené adamantylové nukleosidy byly použity pro tvorbu inkluzních komplexů s β -cyklodextrinem (β -CD) jakožto hostitelskou molekulou za účelem zlepšit jejich rozpustnost v polárním prostředí a prostudovat vliv přítomnosti makrocyklu na biologickou aktivitu. Biologická aktivita tak byla zkoumána nejen u samotných připravených sloučenin **24–33**, ale také u jejich komplexů s β -CD. Byl zjišťován účinek sloučenin proti dvěma typům lidského nádorového onemocnění, a sice vůči chronické myeloidní leukémii (K562) a akutní myeloidní leukémii (MV4;11). Nejsilnější cytotoxicitu o hodnotě 12,3 μ M prokázal nukleosid **28** proti buňkám MV4;11. Látka **28** společně se sloučeninou **32** projevíly odezvu vůči oběma nádorovým liniím. Obě mají zavedený *para* adamantylový substituent s oxo- nebo hydroxylovou skupinou mezi adamantylem a benzenovým kruhem v poloze C6 a oba obsahují v poloze C2 atom chloru. Naproti tomu sloučeniny **24**, **25**, **27** a **33** neúčinkovaly ani na jeden z testovaných cílů. Nutno zdůraznit, že mezi nimi byly oba modelové nukleosidy s fenylem v poloze C6 purinového kruhu. Naopak tomu bylo u testů na inhibici enzymu CKX, v nichž se jako nejúčinnější projevil právě modelový nukleosid **27** s atomem chloru v poloze C2 purinového kruhu.

Zbývající připravené nukleosidy **34–38** testům na biologickou aktivitu podrobeny nebyly, jelikož se nezdařilo připravit je v množství nezbytném pro realizaci strukturální analýzy i pro testování biologických účinků. V budoucnu by bylo žádoucí připravit tyto látky již optimalizovanou a ověřenou cestou v dostatečném množství. Jsme přesvědčeni, že přítomnost zbytku 3-aminopropan-1-olu v poloze C2 purinového kruhu skýtá velký potenciál jak pro zlepšení rozpustnosti, tak pro zesílení konečného biologického efektu.

Z obecného hlediska byla rozšířena řada biologicky aktivních nukleosidů nesoucích 1-adamantyl popsanych v kapitole 4. Přestože vzájemné srovnání jejich biologických účinků nelze objektivně provést, je zřejmé, že náš předpoklad o nutnosti dodržet jistou vzdálenost adamantanového skeletu od purinového jádra není zcela nesprávný. Kdyby byla rozpustnost námi připravených sloučenin ve vodném prostředí ještě o něco lepší, je možné, že se biologická aktivita prokáže i u dalších z testovaných nukleosidů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ CHRISTENSEN, Helle M., Stefan OSCARSON a Henrik H. JENSEN. *Carbohydrate Research*, **2015**, *408*, 51–95. DOI: 10.1016/j.carres.2015.02.007.
- ² RATNER, Daniel M., Edward R. MURPHY, Manish JHUNJHUNWALA, Daniel A. SNYDER, Klavs F. JENSEN a Peter H. SEEBERGER. *Chemical Communications*. **2005**, *403* (5), 578–580. DOI: 10.1039/B414503H.
- ³ CRICH, David. *Accounts of Chemical Research*. **2010**, *43* (8), 1144–1153. DOI: 10.1021/ar100035r.
- ⁴ WEIGNEROVÁ, Lenka, Eva RAJNOCHOVÁ-HERKOMMEROVÁ a Vladimír KŘEN. *Chemické Listy*. **1999**, *93*, 781–787.
- ⁵ WHITFIELD, Dennis M. *Carbohydrate Research*. **2015**, *403*, 69–89. DOI: 10.1016/j.carres.2014.05.021.
- ⁶ RANADE, Sneha C. a Alexei V. DEMCHENKO. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. **2013**, *32* (1), 1–43. DOI: 10.1080/07328303.2012.749264.
- ⁷ DEMCHENKO, Alexei V. Edited by. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. ISBN 9783527317806.
- ⁸ MCMURRY, John. *Organic Chemistry*. 8th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, c2012. ISBN 0840054440.
- ⁹ CUMPSTEY, Ian. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2012**, *10* (13), 2503–2508. DOI: 10.1039/c2ob06696c.
- ¹⁰ BOHÉ, Luis a David CRICH. *Carbohydrate Research*. **2015**, *403*, 48–59. DOI: 10.1016/j.carres.2014.06.020.
- ¹¹ HUANG, Min, Pascal RETAILLEAU, Luis BOHÉ a David CRICH. *Journal of the American Chemical Society*. **2012**, *134* (36), 14746–14749. DOI: 10.1021/ja307266n.
- ¹² DAVIS, Benjamin G. a Antony J. FAIRBANKS. *Carbohydrate Chemistry*. New York: Oxford University Press, 2002. ISBN 0198558333.
- ¹³ BOONS, Geert-Jan a Karl HALE. *Organic Synthesis with Carbohydrates*. Malden, MA U.S.A.: Blackwell Science, 2000. ISBN 0632045086.
- ¹⁴ VORBRÜGGEN, Helmut a Carmen RUH-POHLENZ. *Handbook of Nucleoside Synthesis*. New York: Wiley, 2001. ISBN 0471093831.
- ¹⁵ CAMPBELL, Mary K. a Shawn O. FARRELL. *Biochemistry*. 8th ed. Stamford: Cengage Learning, c2015. ISBN 978-1-285-42910-6.
- ¹⁶ ČERNÝ, Miloslav, Tomáš TRNKA a Miloš BUDĚŠÍNSKÝ. *Sacharidy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010. Chemické listy. ISBN 978-80-86238-81-4.
- ¹⁷ KNAPP, Spencer. *Chemical Reviews*. **1995**, *95* (6), 1859–1876. DOI: 10.1021/cr00038a006.
- ¹⁸ ZHONG, Minghong, Ireneusz NOWAK a Morris J. ROBINS. *Organic Letters*. **2005**, *7* (21), 4601–4603. DOI: 10.1021/ol051573p.

- 19 NIEDBALLA, Ulrich a Helmut VORBRÜGGEN. *Angewandte Chemie International Edition*. **1970**, 9, 461–462. DOI: 10.1002/anie.197004612.
- 20 NIEDBALLA, Ulrich a Helmut VORBRÜGGEN. *Journal of Organic Chemistry*. **1974**, 39 (25), 3654–3660. DOI: 10.1021/jo00939a008.
- 21 VORBRÜGGEN, Helmut, Konrad KROLIKIEWICZ a Bärbel BENNUA. *Chemische Berichte*. **1981**, 114, 1234–1255. DOI: 10.1002/cber.19811140404.
- 22 VORBRÜGGEN, Helmut. *Helvetica Chimica Acta*. **2011**, 94, 947–965.
- 23 BOOKSER, Brett C. a Nicholas B. RAFFAELE. *Journal of Organic Chemistry*. **2007**, 72, 173–179. DOI: 10.1021/jo061885l.
- 24 SUN, Jianyun, Yanhui DOU, Haixin DING, Ruchun YANG, Qi SUN a Qiang XIAO. *Marine Drugs*. **2012**, 10 (12), 881–889. DOI: 10.3390/md10040881.
- 25 BENNUA-SKALMOWSKI, Bärbel, Konrad KROLIKIEWICZ a Helmut VORBRÜGGEN. *Tetrahedron Letters*. **1995**, 36 (43), 7845–7848. DOI: 10.1016/0040-4039(95)01667-7.
- 26 LITTLE, James L. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 844, 1–22. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00267-8.
- 27 VORBRÜGGEN, Helmut a Bärbel BENNUA. *Chemische Berichte*. **1981**, 114, 1279–1286. DOI: 10.1002/cber.19811140407.
- 28 TICHÝ, Michal, Radek POHL, Hao Ying XU, Yen-Liang CHEN, Fumiak YOKOKAWA, Pei-Yong SHI a Michal HOCEK. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2012**, 20 (20), 6123–6133. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.021.
- 29 JOULE, John A. a Keith MILLS. *Heterocyclic chemistry*. 5th ed. Hoboken, N. J.: Wiley, c2009. ISBN 9781405133005.
- 30 ZHANG, Chao a Kevan M. SHOKAT. *Tetrahedron*. **2007**, 63 (26), 5832–5838. DOI: 10.1016/j.tet.2007.02.089.
- 31 QU, Guirong, Suhui HAN, Zhiguang ZHANG, Mingwei GENG a Feng XUE. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2006**, 17 (5), 915–922. DOI: 10.1590/S0103-50532006000500015.
- 32 HOLÝ, Antonín. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004. ISBN 80-244-0855-4.
- 33 KORE, Anilkumar R., Bo YANG a Balasubramanian SRINIVASAN. *Current Organic Chemistry*. **2014**, 18 (16), 2072–2107. DOI: 10.2174/1385272819666140714174457.
- 34 WAN, Zhao-Kui, Eva BINNUN, Douglas P. WILSON a Jinbo LEE. *Organic Letters*. **2005**, 7 (26), 5877–5880. DOI: 10.1021/ol052424+.
- 35 FRANCIS, John E., Randy L. WEBB, Geetha R. GHAI, Alan J. HUTCHISON, Michael A. MOSKAL, Reynalda de JESUS, Rina YOKOYAMA, Stephen L. ROVINSKI, Nicolina CONTARDO, Ronald DOTSON, Bryce BARCLAY, George A. STONE a Michael F. JARVIS. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1991**, 34, 2570–2579. DOI: 10.1021/jm00112a035.
- 36 ELZEIN, Elfatih, Rao KALLA, Xiaofen LI, *et al.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2007**, 17 (1), 161–166. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.09.065.

- ³⁷ ROSEMEYER, Helmut. *Chemistry and Biodiversity*. **2004**, *1*, 361–401. DOI: 10.1002/cbdv.200490033.
- ³⁸ a) GONNELLA, Nina C. a John D. ROBERTS. *Journal of the American Chemical Society*. **1982**, *104* (11), 3162–3164. DOI: 10.1021/ja00375a038; b) SEČKÁŘOVÁ, Pavlína, Radek MAREK, Kateřina MALIŇÁKOVÁ, Erkki KOLEHMAINEN, Dana HOCKOVÁ, Michal HOCEK a Vladimír SKLENÁŘ. *Tetrahedron Letters*. **2004**, *45* (33), 6259–6263. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.06.088.
- ³⁹ KLENER, Pavel. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
- ⁴⁰ *Velký lékařský slovník* [online]. ©Maxdorf 1998–2016 [cit. 2016-8-14]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>
- ⁴¹ ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. Vyd. 2., doplněné a zcela přepracované. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-6772-7.
- ⁴² ROBAK, Pawel a Tadeusz ROBAK. *Cancer Treatment Reviews*. **2013**, *39* (8), 851–861. DOI: 10.1016/j.ctrv.2013.03.006.
- ⁴³ KAY, Neil E., Susan M. GEYER, Timothy G. CALL, *et al.* *Blood*. **2007**, *109* (2), 405–411. DOI: 10.1182/blood-2006-07-033274.
- ⁴⁴ ADAM, Zdeněk, *et al.* *Klinická Onkologie*. **2012**, *25* (4), 255–261.
- ⁴⁵ MCGREGOR, Bradley A., Alexander W. BROWN, Michael B. OSSWALD a Michael R. SAVONA. *American Journal of Hematology*. **2009**, *84* (4), 228–230. DOI: 10.1002/ajh.21365.
- ⁴⁶ BERG, Stacey L. *et al.* *Journal of Clinical Oncology*. **2005**, *23* (15), 3376–3382. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.426.
- ⁴⁷ PRUVOST, Alain, Eugènia NEGREDO, Henri BENECH, Frédéric THEODORO, Jordi PUIG, Eulàlia GRAU, Elisabet GARCÍA, José MOLTÓ, Jacques GRASSI a Bonaventura CLOTET. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2005**, *49* (5), 1907–1914.
- ⁴⁸ CLERCQ, Erik De. *Antiviral Drug Strategies*. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. Methods and principles in medicinal chemistry. Vyd. 50. ISBN 352763598X.
- ⁴⁹ LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Ilustroval Jürgen WIRTH. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- ⁵⁰ FEOKTISTOV, Igor a Italo BIAGGIONI. *Pharmacological Reviews*. **1997**, *49* (4), 381–402.
- ⁵¹ AL JAROUDI, Wael a Ami E. ISKANDRIAN. *Journal of the American College of Cardiology*. **2009**, *54* (13), 1123–1130. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.04.089.
- ⁵² SACHDEVA, Sakshi a Monika GUPTA. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2013**, *21* (3), 245–253. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.011.

- ⁵³ JACOBSON, Kenneth A. a Zhan-Guo GAO. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2006**, 5 (3), 247–264. DOI: 10.1038/nrd1983.
- ⁵⁴ DHALLA, Arvinder K., Mei-Yee WONG, Wei-Qun WANG, Italo BIAGGIONI a Luiz BELARDINELLI. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2006**, 316 (2), 695–702.
- ⁵⁵ MURRAY, John J., John M. WEILER, Lawrence B. SCHWARTZ, *et al.* *Circulation: Cardiovascular Imaging*. **2009**, 2 (6), 492–498. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.108.817932.
- ⁵⁶ VARANI, Katia, Fabrizio VINCENZI, Alberto TOSI, *et al.* *British Journal of Pharmacology*. **2010**, 160 (1), 101–115. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00667.x.
- ⁵⁷ SNIADY, Adam, Matthew W. BEDORE a Timothy F. JAMISON. *Angewandte Chemie International Edition*. **2011**, 50 (9), 2155–2158. DOI: 10.1002/anie.201006440.
- ⁵⁸ HOCEK, Michal a Miroslav FOJTA. *Chemical Society Reviews*. **2011**, 40 (12), 5802–5814. DOI: 10.1039/c1cs15049a.
- ⁵⁹ SÁNCHEZ, Sergio A. a Arnold L. DEMAIN. *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, U. K.: Caister Academic Press, 2015. ISBN 978-1-908230-54-6.
- ⁶⁰ SHABAROVA, Zoe A. a Alexey A. BOGDANOV. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*. New York: VCH, c1994. ISBN 3527290214.
- ⁶¹ TANAKA, Yukinori, Hideaki NANAMIYA, Koichi YANO, Koji KAKUGAWA, Fujio KAWAMURA a Kozo OCHI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2013**, 57 (4), 1948–1951. DOI: 10.1128/AAC.02604-12.
- ⁶² a) KODAMA, Eiichi N., Ronald P. MCCAFFREY, Keisuke YUSA, Hiroaki MITSUYA, *et al.* *Biochemical Pharmacology*. **2000**, 59 (3), 273–281. DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00325-1; b) CHO, Hyun-Jeong, Jae Youl CHO, Man Hee RHEE a Hwa-Jin PARK. *European Journal of Pharmacology*. **2007**, 558 (1–3), 43–51. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.11.073.
- ⁶³ a) BOURDERIOUX, Aurelie, Petr NAUŠ, Pavla PERLÍKOVÁ, *et al.* *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 54 (15), 5498–5507. DOI: 10.1021/jm2005173; b) LONG, Mary C. a William B. PARKER. *Biochemical Pharmacology*. **2006**, 71 (12), 1671–1682. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.03.006.
- ⁶⁴ NISLER, Jaroslav, Marek ZATLOUKAL, Igor POPA, Karel DOLEŽAL, Miroslav STRNAD a Lukáš SPÍCHAL. *Phytochemistry*. **2010**, 71 (7), 823–830. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.01.018.
- ⁶⁵ VISTOLI, Giulio, Andrea BRIZZOLARI, Elena FAIONI, Cristina RAZZARI a Enzo SANTANIELLO. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2014**, 24 (24), 5652–5655. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.
- ⁶⁶ HORGAN, Ronald a Eroll W. HEWETT, *et al.* *Tetrahedron Letters*. **1973**, 30, 2827–2828. HORGAN, Ronald, Eroll W. HEWETT a kol. *Phytochemistry*. **1975**, 14, 1005–1008.

- ⁶⁷ a) SÁENZ, Luis, Lyn H. JONES, Carlos OROPEZA, D. VLÁČIL a Miroslav STRNAD. *Plant Growth Regulation*. **2003**, 39 (3), 205–215. DOI: 10.1023/A:1022851012878; b) ARCISZEWSKI, Jan, Frank MASSINO a Brian F. C. CLARK. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2007**, 40 (3), 182–192. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.024.
- ⁶⁸ a) HOYEROVÁ, Klára, Alena GAUDINOVÁ, Jiří MALBECK, Petre I. DOBREV, Tomáš KOCÁBEK, Blanka ŠOLCOVA, Alena TRÁVNÍČKOVÁ a Miroslav KAMÍNEK. *Phytochemistry*. **2006**, 67 (11), 1151–1159. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.03.010; b) VOLLER, Jiří, Marek ZATLOUKAL, René LENOBEL, *et al.* *Phytochemistry*. **2010**, 71 (11–12), 1350–1359. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.04.018.
- ⁶⁹ KOLYACHKINA, Svetlana V., Vitali I. TARAROV, Cyril S. ALEXEEV, *et al.* *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **2011**, 76 (11), 1361–1378. DOI: 10.1135/cccc2011114.
- ⁷⁰ CHOU, An-Hsun, Ying-Ling CHEN, Ching-Chi CHIU, *et al.* *Neuropharmacology*. **2015**, 99, 308–317. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.009.
- ⁷¹ HUANG, Nai-Kuei, Jung-Hsin LIN, Jiun-Tsai LIN, *et al.* *PLoS ONE*. **2011**, 6 (6), e20934. DOI: 10.1371/journal.pone.0020934.
- ⁷² LEE, Yi-Chao, Ying-Chen YANG, Chuen-Lin HUANG, *et al.* *PLoS ONE*. **2012**, 7 (6), e38865. DOI: 10.1371/journal.pone.0038865.
- ⁷³ HUANG, Nai-Kuei, Yijuang CHERN, Jim-Min FANG, Chia-I LIN, Wan-Ping CHEN a Yun-Lian LIN. *Journal of Natural Products*. **2007**, 7 (4), 571–574. DOI: 10.1021/np0605182.
- ⁷⁴ KOCH, Klaus, Erich FAULAND, Kurt STACH, Max THIEL, Wolfgang SCHAUMANN a Karl DIETMANN. *N6-alkyl-adenosine derivatives and process for their preparation*. DIETMANN, Karl. *Boehringer Mannheim GmbH*. C07H19/16; (IPC1-7): A61K27/00. Patent DE1670265A1. Vydáno: 28. 1. 1971.
- ⁷⁵ KIKUGAWA, Kiyomi, Hideo SUEHIRO a Akiji AOKI. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1977**, 25, 2624–2637.
- ⁷⁶ EDWARDS, Christine, Gernot BOCHE, Thomas STEINBRECHER a Susanne SCHEER. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 1*. **1997**, 1887–1894. DOI: 10.1039/A604559F.
- ⁷⁷ RODENKO, Boris, Alida M. VAN DER BURG, Martin J. WANNER, Marcel KAISER, Reto BRUN, Matthew GOULD, Harry P. DE KONING a Gerrit-Jan KOOMEN. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2007**, 51 (11), 3796–3802. DOI: 10.1128/AAC.00425-07.
- ⁷⁸ GAO, Zhan-Guo, Joshua B. BLAUSTEIN, Ariel S. GROSS, Neli MELMAN a Kenneth A. JACOBSON. *Biochemical Pharmacology*. **2003**, 65 (10), 1675–1684. DOI: 10.1016/S0006-2952(03)00153-9.
- ⁷⁹ KNIGHT, Anthony, Jennifer L. HEMMINGS, Ian WINFIELD, Michele LEUENBERGER, Eugenia FRATTINI, Bruno G. FRENGUELLI, Simon J.

- DOWELL, Martin LOCHNER a Graham LADDS. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2016**, 59 (3), 947–964. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01402.
- 80 VÍCHA, Robert, Michal ROUCHAL, Zuzana KOZUBKOVÁ, Ivo KUŘITKA, Radek MAREK, Petra BRANNÁ a Richard ČMELÍK. *Supramolecular Chemistry*. **2011**, 23 (10), 663–677. DOI: 10.1080/10610278.2011.593628.
- 81 GAVRILOVA, N. A., T. A. FROLENKO, E. S. SEMICHENKO a G. A. SUBOCH. *Russian Journal of Organic Chemistry*. **2010**, 46 (5), 777–778. DOI: 10.1134/S1070428010050349.
- 82 ROUCHAL, Michal, Jana RUDOLFOVÁ, Vladimír KRYŠTOF, Veronika VOJÁČKOVÁ, Richard ČMELÍK a Robert VÍCHA. *International Journal of Molecular Science*. **2021**, 22, 12675. DOI: 10.3390/ijms222312675.
- 83 ROUCHAL, Michal, Alena MATELOVÁ, Fabiana PIRES DE CARVALHO, Robert BERNAT, Dragan GRBIĆ, Ivo KUŘITKA, Martin BABINSKÝ, Radek MAREK, Richard ČMELÍK a Robert VÍCHA. *Supramolecular Chemistry*. **2013**, 25 (6), 349–361. DOI: 10.1080/10610278.2013.783916.
- 84 TADDEI, David, Petr KILIAN, Alexandra M. Z. SLAWIN a J. Derek WOOLLINS. *Organic Biomolecular Chemistry*. **2004**, 2, 665–670. DOI: 10.1039/B312629C.
- 85 GERGELA, David. *Příprava 6,9-disubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 82 s. Vedoucí práce Rouchal, Michal.
- 86 ZHONG, Minghong, Ireneusz NOWAK a Morris J. ROBINS. *Organic Letters*. **2005**, 7 (21), 4601–4603. DOI: 10.1021/ol051573p.
- 87 MCNAMARA, Dennis J., P. Dan COOK, Lois B. ALLEN, Mary J. KEHOE, Carolyn S. HOLLAND a Annette G. TEEPE. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1990**, 33, 2006–2011.
- 88 UGARKAR, Bheemarao G., Angelo J. CASTELLINO, Jay S. DARE, Michele RAMIREZ-WEINHOUSE, Joseph J. KOPCHO, Sanna ROSENGREN a Mark D. ERION. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2003**, 46 (22), 4750–4760. DOI: 10.1021/jm030230z.
- 89 BLACKBURN, G. Michael, *et al.* *Nucleic acids in chemistry and biology*. Cambridge: RSC Publishing, c2006, ISBN 978-0-85404-654-6.
- 90 LEE, Seongmin, Chayasith UTTAMAPINANT a Gregory L. VERDINE. *Org. Let.* **2007**, 9 (24), 5007–5009. DOI: 10.1021/ol702222z.
- 91 HOCEK, Michal, Antonín HOLÝ, Hana DVOŘÁKOVÁ. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **2002**, 67, 325–335. DOI: 10.1135/cccc20020325.
- 92 a) WANG, Zerong. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. John Wiley & Sons, Inc. 2010, ISBN 978-0-471-70450-8; b) TICHÝ, Michal, Sabina SMOLEN, Eva TLOUŠŤOVÁ, Radek POHL, Tomáš OŽDIAN, Klára HEJTMÁNKOVÁ, Barbora LIŠKOVÁ, Soňa GURSKÁ, Petr DŽUBÁK, Marián HAJDÚCH a Michal HOCEK. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, 60, 2411–2424. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01766.

- ⁹³ ROUCHAL, Michal. *Cílená modifikace biologicky aktivních látek*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011. Vedoucí práce Klásek, Antonín.
- ⁹⁴ a) SCHMÜLLING, Thomas, Tomás WERNER, Michael RIEFLER, Eva KRUPKOVÁ, Isabel BARTRINA y MANNS. *Journal of Plant Research*. **2003**, *116*, 241–252. DOI: 10.1007/s10265-003-0096-4;
- ⁹⁵ RONG, Chenyu, Yuexin LIU, Zhongyuan CHANG, Ziyu LIU, Yanfeng DING, Chengqiang DING. *Journal of Experimental Botany*. **2022**, erac088. DOI: 10.1093/jxb/erac088.
- ⁹⁶ ZATLOUKAL, Marek, Markéta GEMROTOVÁ, Karel DOLEŽAL, Libor HAVLÍČEK, Lukáš SPÍCHAL, Miroslav STRNAD. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2008**, *16* (20), 9268–9275. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.09.008.
- ⁹⁷ VAN VOORTHUIZEN, Matthew J., Jaroslav NISLER, Jiancheng SONG, Lukáš SPÍCHAL a Paula E. JAMESON. *Plants*. **2021**, *10* (39). DOI: 10.3390/plants10010039.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Obecné znázornění stereoisomerie glykosidů.
- Obrázek 2: Struktura adenosinu (nukleosid) a adenosinmonofosfátu (nukleotid).
- Obrázek 3: Možné tautomery purinu.
- Obrázek 4: Klinicky využívaná antileukemika.
- Obrázek 5: Purinové inhibitory nukleosidové reverzní transkriptasy.
- Obrázek 6: Agonisté adenosinového receptoru.
- Obrázek 7: Vybraná přírodní nukleosidová antibiotika.
- Obrázek 8: „Aromatické“ cytokininové ribosidy.
- Obrázek 9: Dosud připravené adamantylované purinové nukleosidy.
- Obrázek 10: Obecná struktura připravovaných nukleosidů.
- Obrázek 11: Obecné znázornění přípravy a možných modifikací nukleosidů.
- Obrázek 12: Nežádoucí produkty vzniklé během chlorací guaninu.
- Obrázek 13: „Modelové“ nukleosidy nesoucí sekundární aromatický amin v poloze C6 purinového kruhu.
- Obrázek 14: ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **38**.
- Obrázek 15: Očekávané produkty z reakce uvedené na Schématu 25.
- Obrázek 16: ^1H NMR spektrum sloučeniny **32** (A) a komplexu **32** s β -CD (B), ve spektru B byla použita presaturace signálu HDO.
- Obrázek 17: Výřez spektra ROESY komplexu **32** s β -CD. Měřeno v $\text{DMSO-}d_6$: D_2O (2:1, v:v) při 303 K, 400 MHz s použitím presaturace signálu HDO.
- Obrázek 18: ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi sloučeniny **32** a β -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.
- Obrázek 19: Obecná struktura testovaných sloučenin.
- Obrázek 20: Inhibitory enzymu CKX.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ac	acetyl
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ALL	akutní lymfocytární leukemie
AL	akutní leukemie
AR	adenosinový receptor
Bn	benzyl
BOP	1- <i>H</i> -benztriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)fosfoniumhexafluor fosfát
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
Bz	benzoyl
CD	cyklodextrin
CDK-2	cyklin-dependentní kinasa
CID	kolizí indukovaná disociace
CKX	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
CL	chronická leukemie
CLL	chronická lymfocytární leukemie
DCE	dichlorethan
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMA	<i>N,N</i> -dimethylanilin
DMAM	<i>N,N</i> -dimethylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC ₅₀	poloviční účinná koncentrace
ENT	rovnovážný nukleosidový transportér
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
Et	ethyl
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GD	glykosylový donor
GIC ₅₀	poloviční růstová inhibiční koncentrace
HAART	vysoce účinné antiretrovirální terapie
HCL	vlasatobuněčná leukemie
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMDS	hexamethylidisilazan
HMPA	hexamethylfosforamidu
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
<i>i</i> -Pr	isopropyl
IR	infračervená spektroskopie
K _a	asociační konstanta
K _i	vazebná afinita ligandu

LK	Lewisovy kyseliny
Me	methyl
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MW	mikrovlnné záření
NMR	nukleární magnetická rezonance
NRTIs	inhibitory nukleosidové reverzní transkriptasy
NS	neúčastníci se skupina
OS	odstupující skupina
Phth	ftalimid
RNA	ribonukleová kyselina
TBAF	tetrabutylamonium-fluorid
TCS	trimethylchlorsilan
TEA	triethylamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMSCl	trimethylsilylchlorid
TMSOTf	trimethylsilyltrifluormethansulfonát
VL	výchozí látka

Buněčné nádorové linie:

CEM	T-lymfocytární leukemie
HeLa	děložního čípku
HL60	promyelocytární leukemie
K562	chronická myeloidní leukemie
MCF7	prsu
MV4;11	akutní myeloidní leukemie

Cytokininy:

<i>iP</i>	<i>N</i> 6-isopentenyladenin
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>mT</i>	<i>m</i> -topolin
<i>oT</i>	<i>o</i> -topolin
<i>pT</i>	<i>p</i> -topolin
BA	<i>N</i> 6-benzyladenin
K	kinetin
R	„cytokinin“-9- β -D-ribofuranosid

CURRICULUM VITAE

Jméno a příjmení (rodné): Jana Rudolfová (Hermanová)
Datum a místo narození: 24. září 1986, Kroměříž
Bydliště: Zádveřice 516, 763 12 Zádveřice-Raková
Kontakt: email jana.rudolfova@centrum.cz

Zaměstnání:

2019–dosud Rodičovská dovolená
2017–2018 Laborantka, Oddělení kvality a jakosti, Jacobs Douwe Egberts, s.r.o., Valašské Meziříčí

Vzdělání:

2012–dosud UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, doktorské studium, studijní obor: Technologie potravin, téma disertační práce: *Syntéza a studium biologických účinků purinových nukleosidů substituovaných 1-adamantylem.*
Únor–červen 2010 Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gölköy Kampüsü, Bolu (Turecko), Erasmus+ program.
2010–2012 UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, navazující magisterské studium, studijní obor: Chemie potravin a bioaktivních látek. Ukončeno státní závěrečnou zkouškou.
2007–2010 UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, bakalářské studium, studijní obor: Chemie a technologie potravin. Ukončeno státní závěrečnou zkouškou.
2006–2007 Jazyková škola *Hello*, Ostrava, pomaturitní studium anglického jazyka. Ukončeno osvědčením.
2002–2006 Gymnázium Ladislava Jaroše, Holešov. Ukončeno maturitní zkouškou.

Účelové publikace:

2016 HERMANOVÁ, Jana. *Syntéza a studium biologických účinků purinových nukleosidů substituovaných 1-adamantylem.* Pojednání ke státní doktorské zkoušce.
2012 HERMANOVÁ, Jana. *Příprava N⁹-glukosylovaných purinů.* Diplomová práce.
2010 HERMANOVÁ, Jana. *Stanovení kyselosti a vybraných chemických parametrů v obilovinách.* Bakalářská práce.

Účast na grantových projektech:

- 2016 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, **IGA/FT/2016/001** – *Multitopické ligandy pro pokročilé supramolekulární systémy*. (spoluřešitel)
- 2015 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, **IGA/FT/2015/005** – *Syntéza a charakterizace molekulárních komponent a studium vlastností souvisejících supramolekulárních systémů*. (spoluřešitel)
- 2014 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, **IGA/FT/2014/002** – *Multikomponentní supramolekulární systémy*. (hlavní řešitel projektu)
- 2013 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, **IGA/FT/2013/008** – *Syntéza a studium fyzikálně-chemických vlastností molekulárních komponent pro supramolekulární systémy na bázi adamantanu*. (spoluřešitel)

Publikační aktivity:

ROUCHAL, Michal, Jana RUDOLFOVÁ, Vladimír KRYŠTOF, Veronika VOJÁČKOVÁ, Richard ČMELÍK, Robert VÍCHA. *Adamantane-Substituted Purines and Their β -Cyclodextrin Complexes: Synthesis and Biological Activity*. *International Journal of Molecular Science*. **2021**, 22, 12675.

RUDOLFOVÁ, Jana, Vladimír KRYŠTOF, Robert VÍCHA a Michal ROUCHAL. *Adamantane-Substituted Purine Nucleosides: Synthesis, Host–Guest Complexes with β -Cyclodextrin and Biological Activity*. 2022, připravován.

Konferenční příspěvky:

HERMANOVÁ, Jana, Michal ROUCHAL, Robert VÍCHA: *Synthesis of Novel Purine Ribonucleosides Bearing Adamantane Moiety*. *15. Österreichische Chemietage*, Graz, Rakousko **2013**, PO-118.

HERMANOVÁ, Jana, Michal ROUCHAL, Robert VÍCHA: *Preparation of New Adamantylated Purine Ribonucleosides*. *16th Tetrahedron Symposium: Challenges in Bioorganic and Organic Chemistry*, Berlín, Německo **2015**, P2.103.

Absolvované kurzy a získané certifikáty:

- 2018 Kurz zdravotníka zotavovacích akcí (Kroměříž)
- 2017 Základní senzorické zkoušky (Valtice)
- 2016 Základní baristický seminář „Od keře až k espressu“ (Praha)

Členství v organizacích:

- 2018–2021 Junák – český skaut, z. s. (dobrovolník)
- 2012–2016 Česká společnost chemická (člen)

Jana Rudolfová

**Syntéza a studium biologických účinků purinových nukleosidů
substituovaných 1-adamantylem**

Synthesis and Study of Biological Activity of Purine Nucleosides Substituted
with 1-Adamantyl

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Jana Rudolfová

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání: 2022

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-102-3

