

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



N⁷-regioselektivne glykozylácie derivátov purínu

Diplomová práca

Autor:	Bc. Lenka Tranová
Študijný program:	N1407 Chemie
Študijný odbor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ štúdia:	Prezenčné
Vedúci práce:	doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.

Pod'akovanie

Na tomto mieste úprimne ďakujem svojmu vedúcemu doc. RNDr. Jakubovi Stýskalovi, PhD. za možnosť venovať sa zaujímavej téme v oblasti organickej syntézy, za skvelé vedenie práce, za čas, ktorý mi venoval a za predané hodnotné skúsenosti, čo si mimoriadne cením. V priebehu celého štúdia mi bol nedostižným príkladom prakticky vzdelaného, výnimočne pracovne aktívneho a čestného človeka.

Vďaka patrí aj celému kolektívu Katedry organickej chémie za príjemné pracovné prostredie. V neposlednej rade ďakujem svojej rodine za nekonečnú dôveru a podporu počas celej doby môjho štúdia a osobitne ešte svojej polovičke Martinovi za jeho pomoc na každom kroku a trpezlivosť so mnou.

Táto záverečná práca vznikla za podpory projektu študentskej grantovej súťaže na UP s registračným číslom IGA_PrF_2019_027 (Vývoj nových syntetických postupů a metod pro přípravu organických sloučenin) a IGA_LF_2019_019 (Syntetické postupy a evaluace vlastností biologicky aktivních látek).

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne pod vedením doc. RNDr. Jakuba Stýskal, Ph.D. a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

Súhlasím s tým, aby moja práca bola sprístupnená v knižnici Katedry organickej chémie, Prírodovedeckej fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dňa:

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora:	Bc. Lenka Tranová
Názov práce:	N ⁷ -regioselektívne glykozylácie derivátov purínu
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školiteľ:	doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	Cieľom tejto diplomovej práce bolo vypracovať syntetickú štúdiu zameranú na problematiku regioselektívnej glykozylácie purínových derivátov na dusíkový atóm N⁷. Ústrednými molekulami záujmu sa stali 6-chlórpurín a 2,6-dichlórpurín, ktoré umožňujú premenu na iné purínové deriváty. Teoretická časť zahŕňa literárnu rešerš zameranú na N⁷ glykozidy purínov z pohľadu biologickej funkcie či aktivity. Následne pojednáva o regioselektivite glykozylačných reakcií na purínoch a o dostupných syntetických možnostiach prípravy N⁹ a N⁷ derivátov. Časť Výsledky a diskusia podáva proces vývoja metódy prípravy N⁷ glykozidov 6-chlórpurínu – uvádza hypotézy, popisuje uskutočnené experimenty, dosiahnuté výsledky a kriticky ich hodnotí. Ďalej popisuje postupy derivatizácie pripravených látok a výsledky aplikácie vyvinutej metódy na iných substrátoch. Experimentálna časť obsahuje reakčné postupy a charakteristiky pripravených N⁷ derivátov.
Kľúčové slová:	N-glykozylácia, purín-7-glykozidy, nukleozidové mimetiká
Počet strán:	96
Jazyk:	Slovenčina

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Lenka Tranová

Title: N⁷-regioselective glycosylations of purine derivatives

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: doc. RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract: The aim of this diploma thesis was a synthetic study focused on issue of regioselectivity of purine glycosylation at N⁷ position. 6-chloropurine and 2,6-dichloropurine have been chosen as pivotal molecules as they give rise to other purine derivatives.

The theoretical part involves a brief survey focused on the biological function and activity of purine N⁷ glycosides. Next, regioselectivity of purine glycosylation is discussed and available synthetic routes to N⁹ and N⁷ derivatives are described.

Results and discussion part deals with the method development process – it introduces hypotheses and describes performed experiments followed by critical analysis. This part also involves derivatization of prepared N⁷ glycosides and results of application of the developed method to other substrates. Experimental section contains reaction procedures and characteristics of novel N⁷ derivatives.

Keywords: N-glycosylation, purine-7-glycosides, nucleoside mimetics

Number of pages: 96

Language: Slovak

Obsah

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1. Biologické aspekty purínových derivátov a glykozidov	9
2.1.1. Prirodzený výskyt a funkcia.....	9
2.1.2. Potenciál a využitie v medicíne	13
2.1.2.1. Terapeuticky využívané analógy purínových nukleozidov	13
2.1.2.2. Biologická aktivita N ⁷ substituovaných purínových derivátov	15
2.2. Syntetické aspekty purínových derivátov a glykozidov	20
2.2.1. Ambidentátna nukleofilita	20
2.2.2. Stereochémia glykozylačných reakcií na anomérnom uhlíku	24
2.2.3. Prístupy k syntéze N ⁹ substituovaných purínových glykozidov	26
2.2.4. Prístupy k syntéze N ⁷ substituovaných purínových glykozidov	30
3. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	37
3.1. Vplyv základných parametrov reakcie	38
3.2. Vplyv Lewisovej kyseliny	41
3.3. Vplyv štruktúry glykozyldonoru	43
3.3.1. Vplyv protektívnych skupín glykozyldonoru	43
3.3.2. Vplyv anomérnej konfigurácie glykozyldonoru.....	47
3.3.3. Vplyv odstupujúcej skupiny glykozyldonoru.....	48
3.3.4. Glykozylačné reakcie ďalších glykozidov	49
3.4. Optimalizácia separácie zmesi izomérov	51
3.5. Optimalizácia deprotektie	52
3.6. Aplikácia vyvinutej metódy pre iné substráty	53
3.7. Identifikácia pripravených glykozidov	56
3.8. Overenie možností C ⁶ substitúcie N ⁷ glukozidu 6-chlórpurínu	60

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	62
6-Chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (87)	63
6-(4-Metoxifynyl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (132)	64
6-(Tiofén-3-yl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (133)	64
6-Merkaptopurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (134)	65
Hypoxantín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (135)	65
6-Chlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (127)	66
6-Chlórpurín-7-α-D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (129)	66
6-Chlórpurín-7-β-D-2'-trifluoracetamido-2'-deoxyglukopyranozid-3',4',6'-triacetát (136)	67
6-Chlórpurín-7-β-D-xylopyranozid-2',3',4'-triacetát (128)	68
6-Chlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (130)	68
2,6-Dichlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (137)	69
2,6-Dichlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (138)	69
2,6-Dichlórpurín-7-α-D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (139)	70
2,6-Dichlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (140)	71
7-Tert-butyl-6-chlórpurín (120)	72
5. ZÁVER	73
6. POUŽITÁ LITERATÚRA	74
7. PRÍLOHY	80

1. Úvod

Purínové a pyrimidínové nukleozidy sú v rôznych podobách priamo zapletené v mnohých významných procesoch živých organizmov. Či už ide o uchovávanie genetickej informácie a o jej následnú expresiu cez mRNA do proteínov, alebo o katalytické pôsobenie, účasť na signalizačných a regulačných dejoch, či energetické zásobenie v bunke. Ich nepopierateľná úloha v bunke loví pozornosť mnohých biológov a chemikov, čím sa v medicínskej chémii vytvorila rozsiahla oblasť výskumu zameraná na nukleozidy, nukleotidy a nukleové kyseliny.

Syntéza nukleozidových analógov a mimetik si kladie za cieľ ovplyvňovať práve nukleozidmi dotknuté deje, a táto myšlienka je podporená viacerými úspešnými molekulami, ktoré vzišli z výskumu posledných desaťročí. Nukleozidové analógy dnes zastávajú významné miesto medzi liečivami pôsobiacimi proti infekciám rôzneho pôvodu, a to najmä ako antivirotiká, či medzi liečivami používanými pri nádorových ochoreniach. Od schválenia cytarabínu v roku 1969 ako prvého chemoterapeutika nukleozidového typu bolo schválených mnoho ďalších, z ktorých môže slúžiť ako príklad purínový arabinozid nelarabín, používaný pri akútnej lymfoblastovej leukémii, alebo kladribín pre terapiu vlasatobunkovej leukémie. Ako ďalšie z rezonujúcich molekúl je možné uviesť napríklad látky, ktoré vzišli z priekopníckej práce Antonína Holého, ako napr. acyklický nukleozidfosfonát tenofovir používaný v terapii HIV, či adefovir používaný v terapii HBV.

Nukleozidové mimetiká vykazujú rozsiahlu štrukturálnu variabilitu, zahŕňajúcu obmeny cukerných častí aj nukleových báz. Avšak jednou z doposiaľ málo prebádaných oblastí nukleozidovej chémie sú nukleozidy s glykozidom viazaným na purínový derivát cez atóm N⁷, tj. regioizoméry k obvykle sa vyskytujúcim N⁹ nukleozidom. Primárny dôvod ich nedotknutého výskumu, zdá sa, tkvie už v ich začiatkovej fáze – absencia efektívnej metódy umožňujúcej prípravu širšieho spektra purínových N⁷ glykozidov. Vyplnenie tejto medzery sa stalo hlavným zámerom tejto diplomovej práce. Našou snahou je teda zvrátiť nepriaznivú selektivitu glykozylačných reakcií do polohy N⁹, a nájsť tak podmienky, ktoré poskytujú čím väčšiu regioselektivitu glykozylácie na želaný N⁷ izomér. Ďalšími cieľmi v rámci syntetickej časti je príprava nových glykozidov 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu slúžiacich ako vhodné intermediáty pre ďalšiu derivatizáciu, a zároveň overenie možností derivatizácie pripravených N⁷ glykozidov. Zavŕšením tejto práce je úmysel podrobiť pripravené látky zbežnému skríningu ich biologickej aktivity.

2. Teoretická časť

Teoretická časť tejto práce je rozdelená do dvoch častí. Prvá časť poskytuje pohľad na purínové deriváty ako z hľadiska funkcie prirodzene sa vyskytujúcich derivátov, tak aj z hľadiska biologickej aktivity, plne zahŕňajúc dostupnú literatúru N⁷ substituovaných purínov. Druhá časť sa zaoberá najmä problematikou regioselektivity reakcií purínov a to vrátane všeobecného pohľadu na ambidentátne nukleofily a takisto princípov využívaných na jej objasnenie.

2.1. Biologické aspekty purínových derivátov a glykozidov

Prvá časť tejto kapitoly zhŕňa purínové deriváty a glykozidy nachádzajúce sa v prírode a stručne podáva ich úlohu a ich prípadné pôsobenie na iné organizmy. Kvôli ich nevyhnutnej prítomnosti v bunkách a zaujímavým účinkom sú molekulami, ktorých mimikovaním získavame možnosť zasahovať rôzne biologické ciele. Druhá časť preto poskytuje prehľad biologicky aktívnych purínových derivátov vrátane liečiv, popisuje spektrum ich farmakologických účinkov a nastieňuje potenciál ďalšieho výskumu.

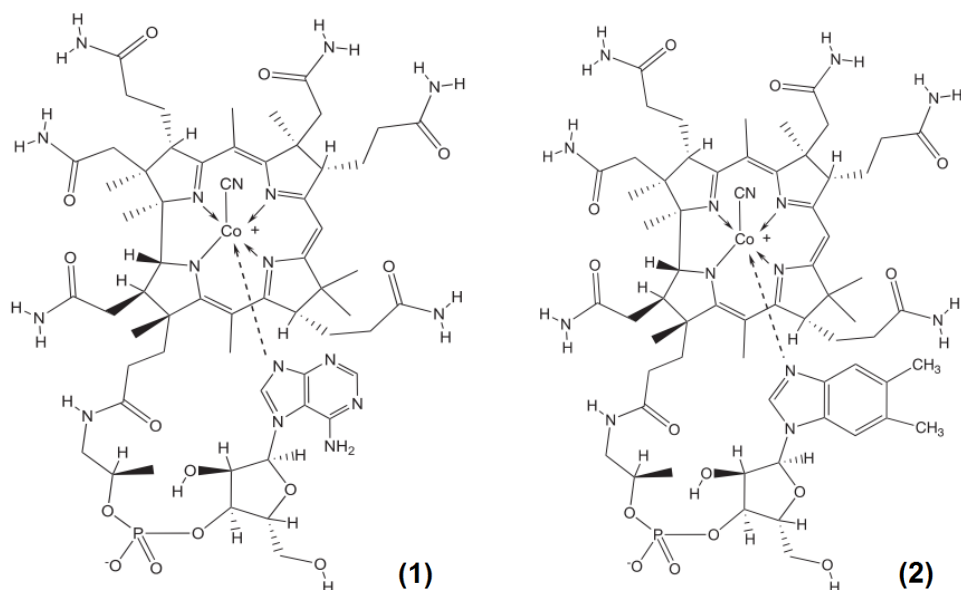
2.1.1. Prirodzený výskyt a funkcia

Purín sa považuje za najabundantnejší heterocyklus v prírode, a to napriek faktu, že samotný purín v prírode nenájdeme. Najväčším príspevkom na jeho abundanciu je jeho prítomnosť v nukleových kyselinách, avšak táto kapitola sa zameria na prírodné purínové deriváty a glykozidy, ktoré nie sú súčasťou týchto biomakromolekúl. Prvým izolovaným purínovým derivátom sa stala v r. 1776 kyselina močová, ktorú extrahoval Scheele z obličkových kameňov a správnu štruktúru dokázal o viac ako sto rokov neskôr Fischer.¹ Kyselina močová je u ľudí posledným metabolitom inak vo vode zle rozpustných purínov, a napriek prítomnosti troch oxo skupín je aj jej rozpustnosť stále obmedzená, čo je príčinou vzniku dnavej artritídy. Ďalšie xantínové deriváty nájdeme medzi sekundárnymi metabolitmi rastlín. Metylované deriváty xantínu – kofeín, teofylín a teobromín - sú alkaloidy prítomné v rastlinách ako sú káva (*Coffea Arabica*), čaj (*Camelia Sinensis*), maté (*Ilex Paraguariensis*) a kakao (*Theobroma Cacao*). Za ich funkciu v rastlinách sa považuje chemická obrana pred patogénmi a herbivormi a taktiež alelopátia, spočívajúca v zabránení rastu iným rastlinám v okolí, ktorá bola u kofeínu dokázaná pomocou transgénnych rastlín.² Spomenuté alkaloidy sú prítomné v diéte človeka a majú v rôznej intenzite obdobné účinky. Kofeín pôsobí najmä ako stimulant centrálnej nervovej sústavy, teobromín ako diuretikum a myorelaxans, a teofylín sa vďaka bronchodilatačnému účinku používa ako antiastmatikum, aj keď v obmedzenej miere kvôli úzkemu terapeutickému indexu. Ďalšie významné biologické vlastnosti nesú purínové deriváty viazané cez dusíkový atóm s glykozidom.

V oblasti purínových glykozidov hrajú kľúčovú rolu vo fungovaní bunčných procesov všetkých organizmov najmä adenínové nukleozidy. Samotný adenosín sa najprv javil ako vazodilatátor a neurotransmitter autonómneho nervového systému, no s pribúdajúcimi štúdiami sa zistilo jeho rozsiahle zapojenie aj do mnohých ďalších procesov, vrátane pôsobenia na kardiovaskulárny systém, endokrinný a imunitný systém. Je tvorený takmer v každej bunke, a pôsobí nielen autokrinne priamo v bunke, kde ovplyvňuje metabolické deje, ale aj parakrinne a systémovo. Jeho hladina v krvi je výsledkom dynamického procesu tvorby a degradácie, keďže jeho polčas sa pohybuje v sekundách.³ Pôsobenie adenosínu je sprostredkované tromi typmi receptorov sprážených s G-proteínmi označovaných ako AR1, AR2A, AR2B a AR3, pričom jeho nadprodukcia sa dáva do súvisu so zápalovými stavmi, ischemiou, nerodegeneratívnymi ochoreniami, astmou či s nádorovými ochoreniami. Kofeín a teofylín sú najznámejšími antagonistami AR.⁴ Liečebne sa využívajú aj agonisti adenosínu – regadenoson a dypiridamol s indikáciami pri kardiovaskulárnych ochoreniach.³

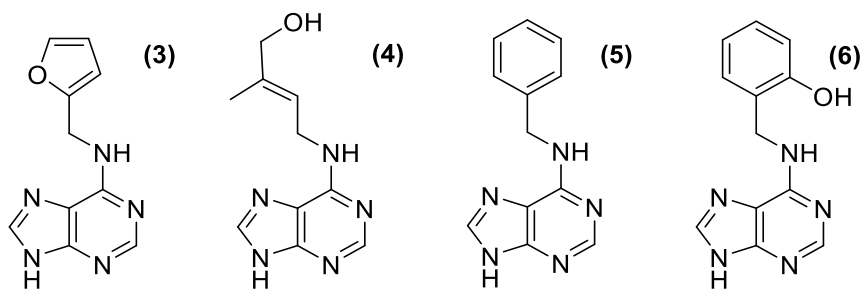
Bunka pre riadenie svojich pochodov využíva aj nukleotidy. Nukleozidfosfáty sú koenzýmami niektorých transferáz a ligáz, nukleozidfosfáty tiež slúžia k uchovávaní energie a pomocou energetického spráženia s endergonickými reakciami umožňujú priebeh takýchto reakcií. Adenosínové nukleotidy tvoria súčasť koenzýmov oxidoreduktáz, ktorými sú nikotínamidové koenzýmy NAD^+ a NADP^+ a flavínový koenzým FAD. Koenzým S-adenosyl-metionín zase umožňuje metylačné reakcie v bunkách, vrátane metylácií DNA či tvorby adrenalínu z noradrenalínu. Nutné je zmieniť aj úlohu cyklického AMP ako druhého posla spúšťajúceho vnútornú kaskádu prenosu signálu aktiváciou proteínkinázy A. Funkciu druhého posla má taktiež cGMP, ktorý sa zúčastňuje aj na procese videnia.⁵

Súčasťou prírodných purínových derivátov sú aj N^7 glykozidy. Dôkazom je pseudovitamín B_{12} (**1**), ktorý je adenínovým analógom vitamínu B_{12} (**2**), kde nahrádza 5,6-dimetylbenzimidazol (Obr. 1). Oba vitamíny obsahujú α -glykozidickú väzbu s ribózou, majú bakteriálny pôvod a akumulujú sa vo vyšších organizmoch. V niektorých riasach bola identifikovaná prítomnosť pseudovitamínu B_{12} dokonca vo vyšších množstvách ako samotného vitamínu B_{12} . Funkcia, absorpcia a interakcia pseudovitamínu B_{12} s vitamínom B_{12} nie je úplne objasnená a pre preukázanie účinnosti, neúčinnosti, či až škodlivosti pseudovitamínu B_{12} skloňovanej kvôli súťaženiu s vitamínom B_{12} o transportný systém znižujúci tak biodostupnosť tohto esenciálneho koenzýmu, sú potrebné ďalšie štúdie.^{6,7}



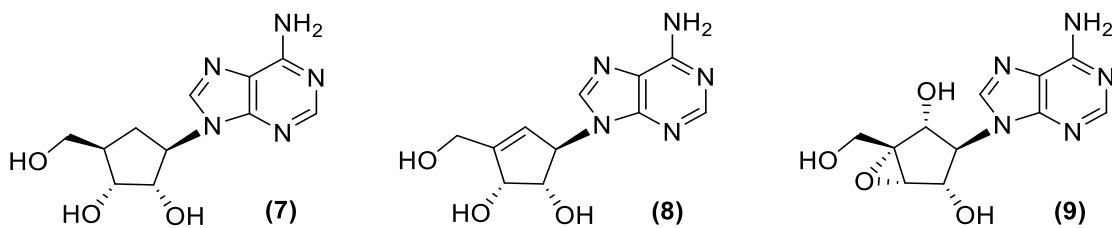
Obr. 1 **pseudovitamín B₁₂** a **vitamín B₁₂** (vo forme kyanokobalamínu)

Adenínový skelet majú vo svojej štruktúre aj niektoré rastlinné hormóny. Ide o skupinu tzv. cytokinínov – skupinu fytohormónov, ktoré regulujú rast a vývoj rastliny (Obr. 2). Prvý zástupca týchto fytohormónov bol neočakávane izolovaný z autoklárovanej DNA spermií sleďa a bol nazvaný kinetín (6-furfurylaminopurín; **3**) z dôvodu jeho silne stimulačného účinku na cytokinézu skúmaného rastlinného tkaniva.⁸ Prirodzene sa vyskytujúce cytokiníny v rastlinách môžu niesť na N⁶ adenínu substituent odvodený od izoprénovej jednotky. Príkladmi izoprenoidných cytokinínov sú *cis*-zeatín, *trans*-zeatín (**4**), dihydrozeatín a isopentenyladenín. Druhou skupinou sú aromatické cytokiníny, ktoré sú menej rozšírené naprieč rastlinnými druhmi a zahŕňajú látky benzylaminopurín (**5**) a topolíny (**6**). Všetky cytokiníny sa obvykle v rastline nachádzajú nielen vo forme voľnej bázy, ale aj v iných metabolických formách, napr. ako glykozidy ribózy a glukózy. Identifikované boli N⁹, ale aj N⁷ a N³ glykozidy a taktiež O-glykozidy v prípade cytokinínov s hydroxy skupinou v postrannom reťazci. Tieto formy sú dokonca v rastlinách prítomné vo vyšších koncentráciách ako voľné bázy. Biologicky aktívnou formou sú však voľné bázy, ktoré sa v porovnaní s ich glykozidovo viazanými derivátmi viažu na receptory prednostne. Cytokiníny vykazujú rôzne účinky počas rôznych životných fáz rastliny a účinok je taktiež závislý od mnohých faktorov prostredia, vrátane svetla a stresu. Pôsobia v interakcií s inými fytohormónmi – auxínmi, a podieľajú sa na regulácii proliferácie, organogenézy, tvorby koreňov, senescencie listov a mnohých iných procesov.^{9,10} Tieto látky a ich syntetické analógy sú zaujímavé aj z hľadiska využitia ako agrochemikálií, tj. pre riadenie vývoja rastlín a zvyšovanie efektivity produkcie v poľnohospodárstve, avšak zatiaľ nie sú kvôli ich komplexite účinkov komercializované.¹¹



Obr. 2 **kinetín** **trans-zeatín** **benzylaminopurín** **o-topolín**

Variabilitu prírodných purínových derivátov potvrdzujú aj aristeromycín (7), neplanocín A (8) a jemu príbuzné látky (Obr. 3), ktoré sú vzácnymi karbocyklickými purínovými nukleozidmi. Kvôli neprítomnosti pravej N-glykozidovej väzby sú stabilnejšie a odolné voči nukleozidázam štiepiacim klasické nukleozidy. Aristeromycín je karbocyklický analóg adenosínu produkovaný baktériami *Streptomyces citricolor*, neplanocín bol získaný kultiváciou *Ampullariella regularis*. Obe látky vykazujú protinádorovú a antivirálnu aktivitu.^{12,13} Antivirálnu aktivitu vykazujú na široké spektrum vírusov rôznych typov, vrátane vírusu HIV, poxvírusov, paramyxo-, rhabdo-, reo-vírusov a ďalších. Za príčinu tohto pôsobenia sa považuje ich silný inhibičný efekt na S-adenosylhomocysteín hydrolázu – enzýmu zapleteného v procese metylačných reakcií pomocou S-adenosylmetionínu, ktoré sú nevyhnutné pre maturáciu virálnej mRNA¹⁴ Tieto látky sa stali prototypom mnohých syntetických karbocyklických nukleozidov s antivirotickým potenciálom.



Obr. 3 **aristeromycín** **neplanocín A** **neplanocín B**

Vyššie popísané deriváty purínov nie sú vyčerpávajúcim zoznamom ich zástupcov v prírode, no už aj táto hrstka vymenovaných demonštruje ich funkčnú rozmanitosť, ktorú purínové deriváty poskytujú.

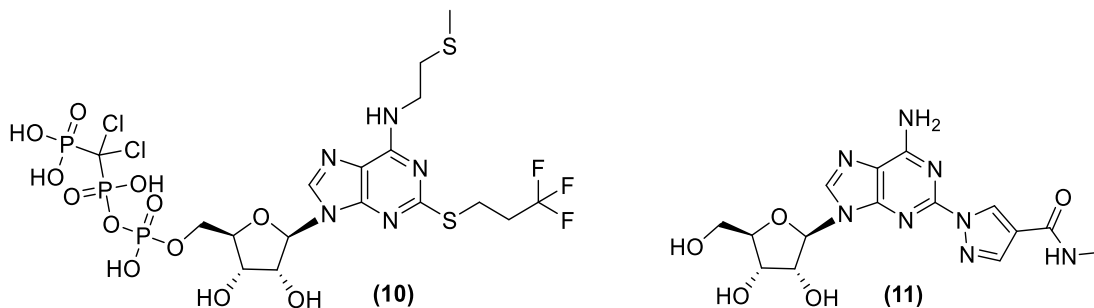
2.1.2. Potenciál a využitie v medicíne

Zo širokého spektra funkcií prirodzene sa vyskytujúcich purínových derivátov je zrejmé, že sa plne ponúka možnosť využiť ich analógy a mimetiká v medicíne. Tento potenciál už využili desiatky látok používaných ako liečivá pre rôzne indikácie a množstvo ďalších prechádza základným výskumom či klinickými skúškami.

2.1.2.1. Terapeuticky využívané analógy purínových nukleozidov

Najčastejšiou indikáciou purínových derivátov, ktoré si našli cestu až k pacientom, sú vírusové infekcie. Ďalšiu významnú skupinu tvoria antineoplasticky pôsobiace látky. Zatiaľ ojedinelými terapeutickými skupinami pre liečivá so štruktúrou purínových nukleozidov sú koronárne vazodilatanciá a antikoagulanciá, pričom v každej zo spomenutých skupín je jedno liečivo tohto typu.

Ako antikoagulans pôsobí kangrelor (**10**) – analóg adenosíndifosfátu schválený v roku 2015. Ide o reverzibilného antagonistu trombocytového receptora P2Y₁₂, ktorého inhibíciou sa zabraňuje agregácii trombocytov. Kvôli priamemu pôsobeniu a teda rýchlemu nástupu a odzneniu účinku sa kangrelor používa intravenózne u pacientov s ischemickou chorobou srdca podstupujúcich perkutánnu koronárny zákrok, pričom v používaných dávkach nastupuje v rámci jednotiek minút a funkcia krvných doštičiek sa po ukončení podávania kangreloru navracia do jednej hodiny.¹⁵



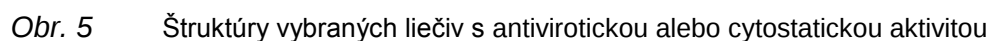
Obr. 4

kangrelor

regadenoson

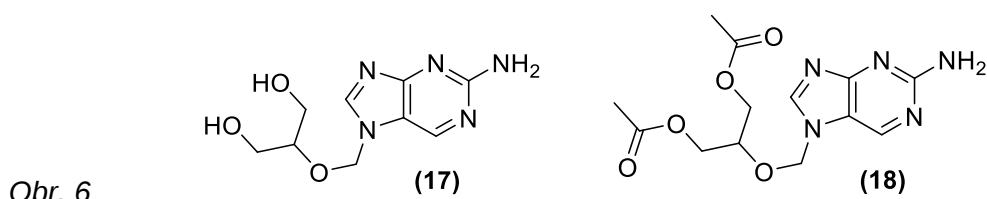
Regadenoson (**11**), selektívne vazodilatans koronárnych ciev schválený FDA v roku 2008, sa využíva diagnosticky ako záťažová látka pri perfúzne scintigrafii myokardu (MPI) a pri invazívnej koronárnej angiografii. Mechanizmom účinku je agonistické pôsobenie selektívne na adenosínový A_{2A} receptor, ktorého aktiváciou dochádza k rozšíreniu koronárnych ciev a zvýšeniu krvného prietoku v nich.¹⁶ Štruktúra regadenosonu v sebe zachováva adenosín, ktorý je na C² substituovaný pyrazolkarboxamidom (Obr. 4).

Za objavom fosfonátov acyklonukleozidov stojí spolupráca Antonína Holého a Erika de Clercq. Metabolicky stabilná fosfonátová skupina zároveň obchádza nevýhodu ostatných nukleozidov, ktorou je pomalý krok prvej fosforylácie nukleozidkinázami nevyhnutnej pre aktivitu. Tenofovir je od roku 2001 používaný pre liečbu infekcie HIV. Kvôli biologickej dostupnosti sa používa vo forme proliečiv, ktorými sú tenofovir disoproxil a tenofovir alafenamid (**12**). Adefovir dipivoxil (**13**) je zase účinný pre liečbu infekcie HBV. Z karbocyklických nukleozidov je možné spomenúť abacavir (**14**), ktorý je ako inhibítor reverznej transkriptázy účinný na HIV a entecavir používaný pre terapiu HBV. Ďalším antivirokom je napríklad širokospektrálne antiherpetikum acyklovir, či ganciklovir účinný pri ochoreniach spôsobených cytomegalovírusmi, ale aj didanozín, penciclovir a mnoho iných. Z purínových nukleozidov používaných pri viacerých typoch leukémie možno uviesť fludarabín, nelarabín či kladribín (**15**) a spomedzi tiopurínových derivátov sa používa 6-merkaptopurín a thioguanín. Azatioprín (**16**), proliečivo merkaptopurínu, sa dnes používa ako chemoterapeutikum zriedka, no zaužívalo sa jeho využitie ako imunosupresívum po orgánových transplantáciách a u autoimunitných ochorení, z nich najmä pri reumatoidnej artritíde a Crohnovej chorobe.



2.1.2.2. Biologická aktivita N⁷ substituovaných purínových derivátov

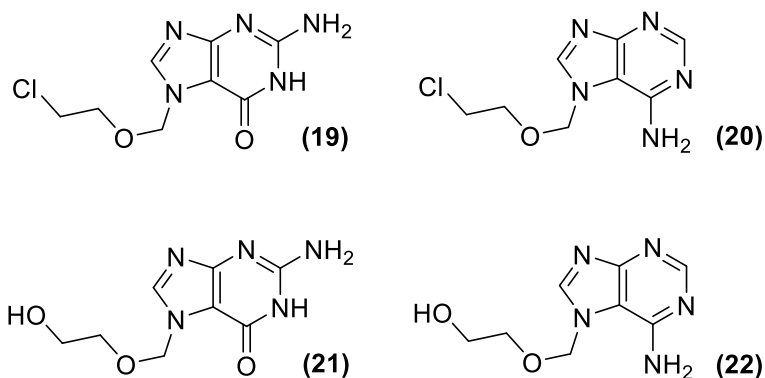
Biologická aktivita N⁷ analógov k bežne sa vyskytujúcim N⁹ purínovým derivátom začala budiť záujem koncom 90. rokov, pričom predmetom skúmania sa zatiaľ nestali glykozidy, ale alkylderiváty, tj. acyklonukleozidy. V prvotných pokusoch N⁷ analógy antivirotický pôsobiach N⁹ derivátov aktivitu nevykazovali^{17–19}, no s ďalšími publikáciami pribudli aj aktívne deriváty. Príkladom môže byť derivát **17**, analóg 6-deoxygancikloviru, ktorý na tzv. Vero bunkách infikovaných HSV-1 aj HSV-2 vykazoval minimálnu inhibičnú koncentráciu v jednotkách mikromolov, rovnako ako príbuzné N⁹ deriváty.²⁰



Purínovým N⁷ acyklickým nukleozidom sa venoval okrem bohatej série klasických acyklonukleozidov aj Antonín Holý a tím Erik-a de Clercq-a. V článku z roku 1995 zaoberajúcim sa antivirotickou aktivitou voči HHV-6 bol zaradený jeden N⁷ derivát medzi 30 testovanými látkami zahŕňajúcimi acyklovir, penciklovir, foscarnet a vybrané fosfonáty acyklonukleozidov. Išlo o derivát **17** pripravený vyššie spomenutými autormi²⁰, ktorý bol v testoch voči herpesvírusu HHV-6 najúčinnnejší, a s hodnotou EC₅₀ = 0,02 μM tak vykazoval aktivitu o 1-3 rády vyššiu voči ostatným látkam. Dobré farmakologické vlastnosti podporoval aj nízky cytostatický efekt na herpesvírusom infikované lymfocyty (CC₅₀), ktorý bol 42 násobne vyšší než stanovená EC₅₀ pre HHV-6. Stanovená aktivita testovaných látok približne korelovala aj s antivirotickou aktivitou voči ľudskému cytomegalovírusu HCMV.²¹ V stotinových až desatinových mikromolárnych koncentráciách sa ukázal účinný aj voči ďalším kmeňom herpes vírusov, a to vrátane Varicella zoster vírusu spôsobujúceho ovčie kiahne a pásový opar.²² Následným skúmaním zistili, že látka **17**, označovaná ako S2242, využíva pre vstup do bunky nukleozidový transport a v bunke je fosforylovaná na jej mono-, di- a tri-fosfáty. Z experimentov takisto zistili, že fosforylácia je pre jej účinok nevyhnutná. Vychádzali z faktov, že v bunkách s neprítomnou deoxycytidín-kinázou sa znížilo množstvo fosforylovaných metabolitov 100 násobne a zároveň, že prídavkom exogénneho deoxycytidínu k wildtype bunkám sa aktivita **17** taktiež rádovo znížila.²³ Pozornosť ešte venovali jeho možnosti využitia voči ortopoxvírusu Variola a to napriek faktu, že tento vírus bol celosvetovo pred viac ako 40 rokmi eradikovaný. Dôvodom je možné zneužitie vírusu pravých kiahní k bioterorizmu, nakoľko žiadny schválený liek na toto ochorenie s 30% mortalitou neexistuje. S2242 a jeho diacetátový prodrug (**18**) podrobili *in-vivo* testom na imunodeficitných myšiach infikovaných ortopoxvírusom Vaccinia s veľmi

dobrými výsledkami – myši, ktorým bol počas desiatich dní perorálne či intraperitonálne podávaný **18** v dávke 100 mg/kg/deň boli úplne pred infekciou ochránené na dobu minimálne troch mesiacov, zatiaľčo myši bez terapie do mesiaca umreli.^{24,25}

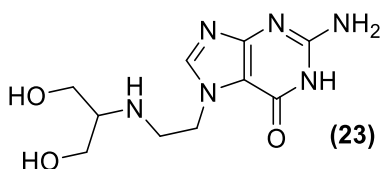
Neskôr boli pripravené viaceré ďalšie N⁷ acyklonukleozidy so záujmom o ich antivirotickú aktivitu, kde sa naskytla možnosť porovnať chlór deriváty **19** a **20** s ich hydroxy analógmi **21** a **22**, pričom došli k záveru nevyhnutnej prítomnosti hydroxy skupiny pre ich pôsobenie.²⁶



Obr. 7

Spektrum biologickej aktivity testovali Fuji et al. pre purínové N⁷ oxidy²⁷. Guanín-7-oxid vykazoval zaujímavú aktivitu voči lymfoblastickým leukemickým bunkám L1210 IC₅₀ = 1 μM. V testovaní na antivirotickú aktivitu mal len mierne účinky a antimikrobiálne na stanovované kmene nepôsobil. Hypoxantín-, 6-merkaptopurín-, ani adenín-7-oxid cytotoxicitu nevykazovali. Prípravou 7-oxidu benzylaminopurínu sa znížila cytokinínová aktivita v porovnaní s materskou molekulou 40 násobne.

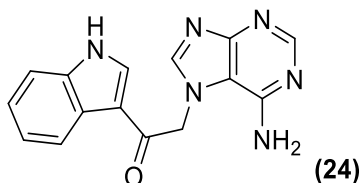
Záujem vyvolali N⁷ deriváty aj pre inhibičný účinok na purín-nukleozid-fosforylázu (PNP), teda enzým, ktorý štiepi N-glykozidovú väzbu a inaktivuje tým aktívne nukleozidové analógy. Z testov vyšiel N⁷ substituovaný acyklonukleozid **23** s hodnotou K_i = 5 μM, čím sa stal trikrát aktívnejší v inhibícii ľudskej PNP z erytrocytov v porovnaní s jeho N⁹ náprotivkom.²⁸



Obr. 8

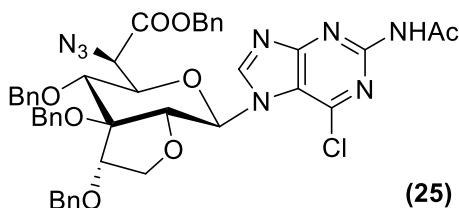
Spektrum účinkov rozšírili aj Peifer et al., keď na základe modelovania do ATP kavity receptoru VEGF-R2 nadizajnovali N-aryletanónové purínové deriváty, vrátane štruktúry

24, ktorú kvôli svojej selektivitě a aktivite k VEGF-R2 označili ako lead štruktúru inhibítorov týchto receptorov.²⁹



Obr. 9

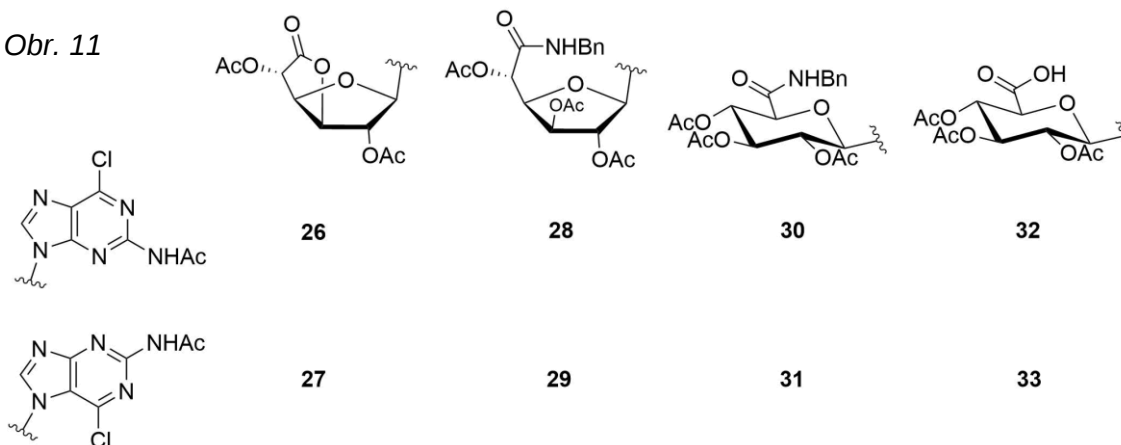
V oblasti popísaných biologických účinkov glykozidov, ktoré sú viazané na purínový derivát cez atóm N⁷, literatúra poskytuje zatiaľ len prvé výhonky. Preto napriek zahrnutiu doposiaľ dostupnej literatúry, táto časť v skutočnosti zhŕňa najmä prácu kolektívu autorov Rauterovej výskumnej skupiny. Ich počiatočné kroky viedli k štúdiu série derivátov na inhibičný efekt acetyl- a butyryl-cholínesterázy, ktorý umožňuje zasiahnuť Alzheimerovu chorobu. Zatiaľčo ako ACHE inhibítory sa ukázali neúčinné, účinnosť sa prejavila u BCHE, konkrétne u látky **25**, ktorá má rovnakú účinnosť s aktuálne používaným liečivom rivastigmínom ($IC_{50} = 0,14 \mu M$ vs. $0,17 \mu M$).³⁰



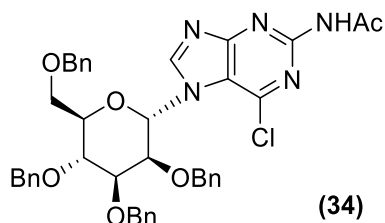
Obr. 10

Naopak aktivitu voči ACHE a inaktivitu voči BCHE odhalili u derivátov kyseliny glukurónovej. Pre porovnanie vplyvu substitúcie pripravovali látky v zmesi N⁷ a N⁹ derivátov (**26-33**), no z N⁷ derivátov sa podarilo stanoviť len **31** a **33** kvôli nemožnosti separácie **27** a **29** od ich N⁹ regioizomérov. U glukopyranuronamidov bol v porovnaní s N⁹ aktívnejší N⁷ derivát **31** ($IC_{50} = 31 \mu M$ vs. $18,7 \mu M$), a opačne to platilo u glukopyranuronidov, kde bol aktívnejší N⁹ derivát **32** ($IC_{50} = 26,9 \mu M$ vs. $37,9 \mu M$).³¹

Obr. 11

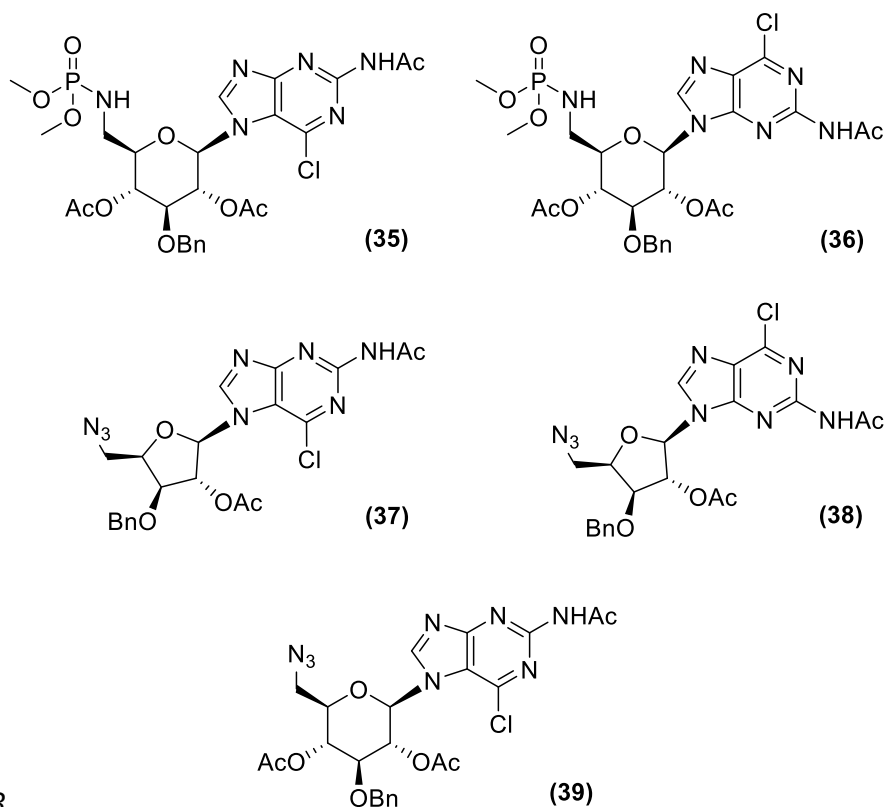


Neskôr boli popísané benzylované N⁷ a N⁹ glykozidy 6-chlórpurínu a 2-acetamido-6-chlórpurínu, z ktorých sa α -manozid **34** stal lead štruktúrou pre selektívne inhibítory BCHE s $K_i = 0,05 \mu\text{M}$.³² Benzylované glykozidy 2-acetamido-6-chlórpurínu vykazovali účinnosť v jednotkách mikromolov aj v testoch na cytotoxicitu na viacerých rakovinových bunecných líniiach, avšak podobnú toxicitu vykazovali aj na nemalígnej línii.³³



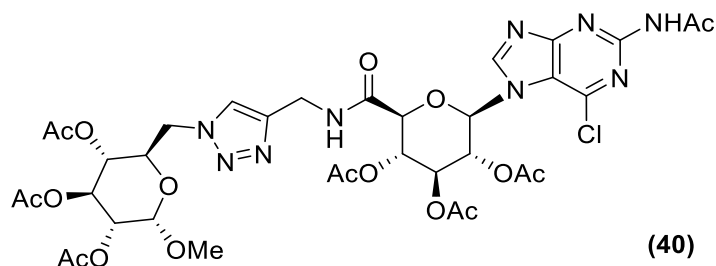
Obr. 12

Najnedávnejší článok Rauterovej výskumnej skupiny sa zamerl na cytostatickú aktivitu fosforamiditov a azidonukleozidov.³⁴ Skúmané fosforamidity N⁷- a N⁹-glukopyranozidu 2-acetamido-6-chlórpurínu (**35** a **36**) boli v koncentrácií pod $100 \mu\text{M}$ neúčinné, no azidoderiváty xylofuranozidu (**37** a **38**) vykazovali voči leukemickej línii K562 cytostatickú aktivitu GI_{50} $9,7 \mu\text{M}$ a $13,6 \mu\text{M}$. Ešte aktívnejšia ale bola látka **39** s $\text{GI}_{50} = 6,8 \mu\text{M}$, čo je síce stále desaťnásobok hodnoty imatinibu, no motivuje k ďalším štrukturálnym optimalizáciám. Išlo o azidoderivát glukopyranozidu, ktorého antiproliferatívne účinky sa prejavili aj u bunecných línii rakoviny prsníka MCF-7 ($\text{GI}_{50} = 29,6 \mu\text{M}$) a BT474 ($\text{GI}_{50} = 13,6 \mu\text{M}$).



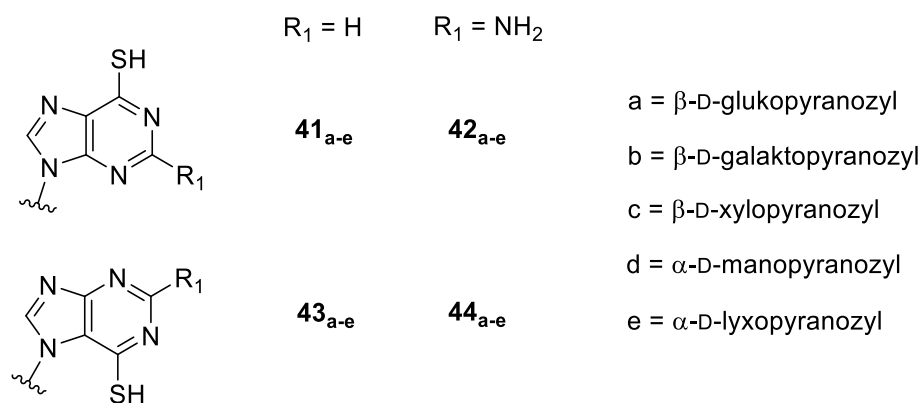
Obr. 13

Bez zistenia významnej inhibície vyšiel z testovania disacharidový nukleozid **40**, a to v testoch voči acetyl- a butyryl- cholinesterázam, karboanhydráze II, komplexu CDK-2/cyklínE, a neúčinný bol aj pri stanovovaní cytotoxickej aktivity k vyššie spomenutým líniam K562 a MCF-7.³⁵



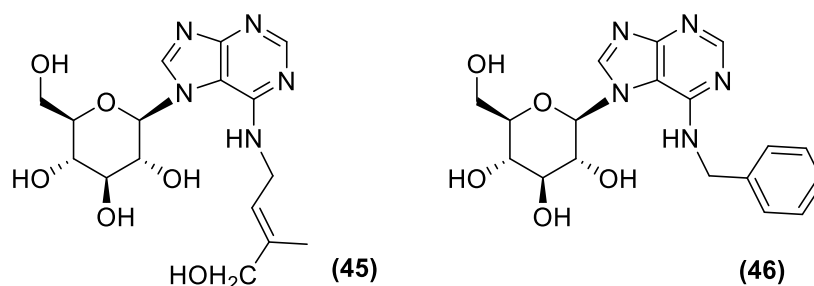
Obr. 14

Potenciálna cytostatická aktivita N⁷ aj N⁹ glykozidov 6-merkaptopurínových derivátov (**41-44_{a-e}**) zaujímala autorov Dimopoulou et al.³⁶ Z testovania dvadsiatich látok voči bunecným líniam L1210, CEM a HeLa vyšli ako najúčinnnejšie N⁹ deriváty **42_b**, **42_d** a **42_e** s IC₅₀ v desiatkach mikromolov, pričom aktivita N⁷ derivátov sa pohybovala v koncentráciách o rád vyšších. Otáznik ale visí nad identitou týchto látok (viď s. 34).



Obr. 15

Adenínové N⁷ glykozidy so štruktúrou cytokinínov boli skúmané aj na ihibičnú aktivitu cyklín-dependentných kináz.³⁷ Testovaný *trans*-zeatín 7-β-D-glukopyranozid (**45**), ani 6-benzylamino-7-β-D-glukopyranozylpurín (**46**) však nevykazovali účinnosť voči kinázam cdc2, cdk5 a cdk4, avšak rovnako bola inaktivita zistená aj pre N⁹ deriváty týchto látok. Bunečné testy skúmajúce antiproliferačné účinky taktiež poukázali na inaktivitu týchto cytokinínov.³⁸



Obr. 16

2.2. Syntetické aspekty purínových derivátov a glykozidov

Táto kapitola teoretickej časti sa venuje viacerým témam, ktoré súvisia s hľadaním metódy regioselektívnej glykozylácie purínových derivátov. Načrtnutá je ambidentálna nukleofilita a prístupy k jej riešeniu, a dotknutá je aj súvislosť štruktúry sacharidu s jeho reaktivitou. Za nimi nasleduje súhrn bežne používaných reakcií pre tvorbu purínových N⁹ derivátov a popísané sú prípravy N⁷ derivátov.

2.2.1. Ambidentálna nukleofilita

V organickej chémii nie je pravidlom, že nukleofilné centrum je v molekule len jedno. Práve naopak, stretnúť sa môžeme s ambidentálnymi až multidentálnymi nukleofilmi. Ambidentálnymi nukleofilmi sú molekuly, ktoré môžu atakovať elektrofil jedným z ich dvoch nukleofilných miest, a poskytovať tak minimálne dva rôzne izoméne produkty, ktorých podiel závisí od spolupôsobenia mnohých faktorov reakcie. Klasickým príkladom môže byť dusitanový anión, ktorého atak cez atóm kyslíka vedie k vzniku esteru kyseliny dusitej, zatiaľčo atak prostredníctvom atómu dusíka poskytuje nitroderivát. Rovnakým prípadom sú kyanidové ióny poskytujúce nitrily a isonitrily, či anióny alifatických nitroderivátov (Schéma 1). Reakciu ambidentátneho nukleofilu vedúcu k vzniku jedného produktu označujeme za regioselektívnu. Asi najviac študované sú enoláty a fenoxidy, kde súťaží C-atak na elektrofil s O-atomom, a zároveň sú často jedinými organickými ambidentálnymi nukleofilmi, ktorých reaktivita sa rieši v knihách základnej aj pokročilej organickej chémie. Pravidlá, ktoré by pomohli určiť výsledok reakcie ambidentátneho nukleofilu s istým elektrofilom za určitých podmienok, by boli veľmi užitočné, no kvôli množstvu ovplyvňujúcich činiteľov to nie je jednoduché, a napriek existencii istých zovšeobecnení je reaktivita často neočakávaná.

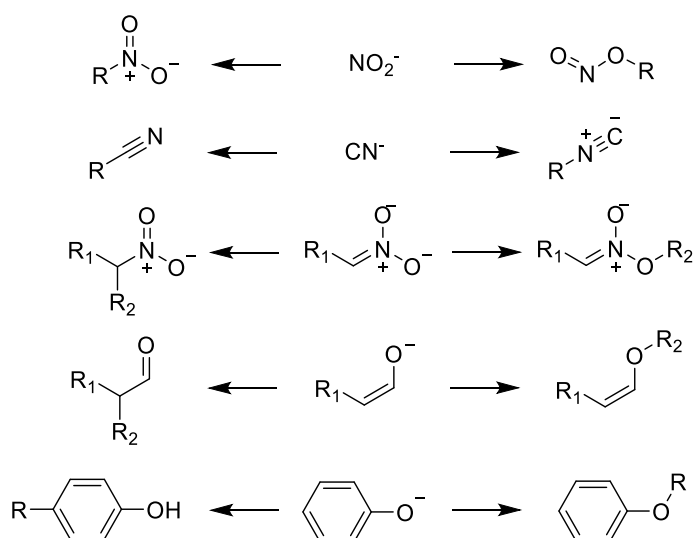
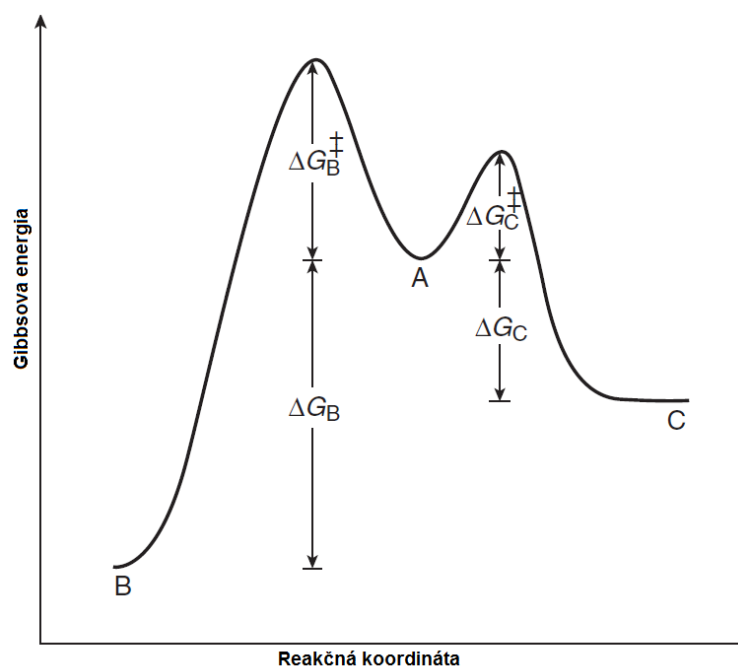


Schéma 1

Príklady ambidentálnych nukleofilov

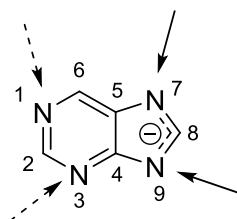
Vlastnosti ambidentátnych nukleofilov boli často popisované pomocou teórie tvrdých a mäkkých Lewisových kyselín a báz (HSAB), ktorá v najjednoduchšej interpretácii hovorí o uprednostňovaných interakciách hard-hard alebo soft-soft, zatiaľčo nepriaznivé sú interakcie typu hard-soft. Táto teória býva kombinovaná s Klopman-Salemovým modelom uvažujúcim HOMO energiu nukleofilu a LUMO energiu interagujúceho elektrofilu³⁹, ktoré je možno považovať za ionizačný potenciál, resp. elektrónovú afinitu. Pokiaľ je energia HOMO nízka, je nízka aj ochota daného nukleofilu poskytovať elektróny. Naopak nukleofil s vysokou energiou HOMO má vyššiu tendenciu elektróny poskytnúť. Nízka hodnota LUMO poukazuje na ochotu elektróny prijať a vysoká zase naopak. Charakter týchto orbitálov ovplyvňuje tvorbu tranzitného stavu a rozdiel ich energií hovorí o energetickej výhodnosti reakcie a mechanizme reakcie, tj. či bude mechanizmus riadený nábojovo alebo orbitálovo. Dôležitým postulátom riešiacim ambidentátnu nukleofilitu je ten, že nábojovo riadený mechanizmus vedie k reakciám v miestach molekúl s najväčšími rozdielmi elektrických nábojov, zatiaľčo orbitálovo riadený mechanizmus vedie k interakciám v miestach s najvyššou elektrónovou hustotou.⁴⁰ Napriek popularite týchto teórií a vysvetleniu viacerých typov reakcií si však Pearsonova HSAB teória a Klopmanova teória nájdu aj kritikov, ktorí popisujú zlyhania týchto teórií napríklad aj pri alkylačných reakciách bežných ambidentátnych nukleofilov.⁴¹ Formulovaný bol ďalší prístup, tzv. Marcusova teória, ktorá je založená na rozlišovaní kineticky a termodynamicky kontrolovanej reakcii. Dva produkty, ktoré môžu vzniknúť v reakcii, majú rozdielnu Gibbsovu energiu a zároveň pre ich vznik je potrebná rozdielna Gibbsova aktivačná energia (Obr. 17). Produkt s nižšou energiou je termodynamicky stabilnejší, označujeme ho za termodynamicky kontrolovaný produkt – v príklade ide o produkt B, pretože $\Delta G_B > \Delta G_C$. Produkt s nižšou aktivačnou energiou označujeme za kineticky kontrolovaný produkt – produkt C, kde $\Delta G_C^\ddagger < \Delta G_B^\ddagger$. Pokiaľ by bola reakcia ireverzibilná, bude vznikať vo väčšom množstve produkt C, pretože sa tvorí rýchlejšie. Avšak ak je reakcia reverzibilná, v čase sa ustavuje rovnováha, v ktorej je dominujúcim alebo výlučným produktom termodynamický produkt. Proces, ku ktorému dochádza je premena A na C, spätná premena C na A, a jeho následná premena na B. Z toho vyplýva možnosť viesť aj reverzibilnú reakciu kinetickou kontrolou, a to v prípade prerušenia reakcie pred ustavením rovnováhy, tj. v čase, keď je prítomné väčšie množstvo kineticky kontrolovaného produktu.⁴² Podrobnejší prehľad o Marcusovej teórii je však za hranicami tohto textu a pozornosť bude ďalej venovaná ambidentátnej reaktivite purínov.



Obr. 17 Profil reakcie s možným vznikom kinetického a termodynamického produktu

Spomenuté princípy sa hojne vyžívajú vo výpočtovej chémii, napr. pre odhad reaktivity študovaných substrátov, kde sa pracuje s rôznymi deskriptormi súvisiacimi so všetkými spomenutými teóriami.

Z doteraz vymenovaných ambidentálnych nukleofilov boli vždy nukleofilmi dva rôzne atómy, tj. atómy značne sa líšiace vo svojich vlastnostiach vrátane polarizovateľnosti, elektronegativity, elektrónovej hustoty a podobne. O niečo väčší problém v regioselektivite reakcie môže nastať v prípadoch, keď sa ambidentálna nukleofilita týka rovnakých atómov, ako je tomu napríklad u purínu. Purín existuje v dvoch tautomérnych formách, tj. ako *7H*-purín a *9H*-purín, ktoré sú v roztoku zastúpené rovnomerne, pričom v kryštalickej forme sa popisuje výlučná prítomnosť *7H*-purínu. Teoreticky sa jedná o tetradentálny nukleofil, no väčšinou sa v reakciách s elektrofilmi tvorí zmes N^7 a N^9 derivátov (Obr. 18). Prípadný vznik N^3 a N^1 derivátu je možné potlačiť tvorbou aniónu, kde záporný náboj majoritne nesú atómy dusíka imidazolového kruhu.



Obr. 18

Stanovením parametrov nukleofility pre anióny viacerých heterocyklov, vrátane purínových derivátov, sa zaoberali Breugst et al.⁴³ Vychádzali z kinetických štúdií reakcií heterocyklických nukleofilov s benzhydriolovými kationmi ako referenčnými elektrofilmi, pre kvantifikáciu nukleofility využívali Mayr-Patzovu rovnicu a nehladiac na vznik regioizomérov určili a porovnali nukleofilitu jednotlivých heterocyklov. Z reaktivity aniónov imidazolu, benzimidazolu a purínu uzavreli, že anelácia benzénového jadra v študovaných reakciách znižuje nukleofilitu takmer päťnásobne, a až desaťnásobne v prípade aniónu purínu, tj. v prípade, keď je k imidazolu prikondenzovaný pyrimidín. Tento efekt je čiastočne kompenzovaný prítomnosťou amino-skupiny, ako je tomu u adenínu, ktorého anión je 2,6-násobne nukleofilnejší než anión purínu. S využitím výpočtovej chémie popísali Stachowicz-Kuśnierz et al. nukleofilitu jednotlivých dusíkových atómov purínu, a to na adeníne a guaníne.⁴⁴ Výpočty boli uskutočňované *in-silico* pomocou metódy založenej na teórii funkcionálu hustoty (DFT). Modelovanou reakciou bola reakcia adenínu či guanínu v neutrálnom aj aniónovom stave s H^+ ako modelovým elektrofilom. Z článku vyplýva, že z hľadiska elektrónovej štruktúry adenínu má N^7 atóm v neutrálnom aj bazickom pH najnukleofilnejší charakter. Zároveň je z pohľadu HSAB teórie najtvrdším endocyklickým dusíkom v molekule, pričom najmäkšie sú atómy dusíka na pyrimidínovom kruhu. Preto produkty vzniknuté N^3 a N^1 atakom extrémne tvrdého H^+ majú vyššiu energiu. Ako bolo spomenuté, nukleofilita N^7 atómu je vyššia aj oproti nukleofilite N^9 atómu, avšak kvôli vyššej energii výsledného produktu vzniknutého N^7 atakom sa táto molekula stáva kineticky priaznivou, no termodynamicky nepriaznivou. Vyššia energia 7*H*-purínu je spôsobená interakciou vodíka z aminoskupiny na C^6 s vodíkom na N^7 , a nie nižšou reaktivitou N^7 . V polárnych solventoch je dokonca N^7 substitúcia aj energeticky najvýhodnejšia, zatiaľčo v bazickom prostredí a nepolárnych rozpúšťadlách, ako aj v plynnej fáze, je pravdepodobnejšia N^9 substitúcia. V závere podotýkajú, že zistené výsledky sú vo väčšinovej zhode s experimentálnymi pozorovaniami, a teda, že k alkyláciám s rôznymi elektrofilmi v bazických podmienkach majoritne dochádza k tvorbe N^9 produktu.

Aj keď v oblasti multidentátnej nukleofility či elektrofility bolo uskutočnených mnoho pokrokov pomáhajúcich objasniť priebeh reakcie, stále zostáva aj veľa nezodpovedaných aspektov a nevysvetlených tendencií v reaktivite, čo však samozrejme pobáda k ďalšiemu štúdiu. V ideálnom prípade by sme pomocou výpočtovej chémie dokázali presne odhadnúť priebeh reakcie, čo sa kvôli nespočetnému množstvu vplyvov a faktorov pôsobiacich na výsledok reakcie, zdá aspoň preteraz nemožné.

2.2.2. Stereochemia glykozylačných reakcií na anomérnom uhlíku

Nepochybnou výzvou pri syntéze glykozidov je dosiahnutie stereoselektivity v glykozylačných reakciách. Želaným výstupom ideálnej glykozylačnej reakcie je tvorba jedného produktu, tj. α - alebo β -anoméru príslušného glykozidu. Regioselektivita nukleofinej substitúcie na anomérny uhlík sacharidu je daná jeho najvyššou reaktivitou a doladená môže byť vhodným výberom odstupujúcej skupiny a takisto výberom vhodných protektívnych skupín pre ostatné hydroxyly.

Vznik zmesi anomérov je dôsledkom obtiažnosti viesť reakciu čisto S_N2 mechanizmom. Podiel S_N1 mechanizmu do reakcie vnáša endocyklický atóm kyslíka, ktorý rezonančnou stabilizáciou podporuje vznik katiónu sacharidu, ku ktorému nukleofil môže pristupovať z oboch strán. Na výslednú konfiguráciu anomérneho uhlíka v produkte a jeho podiel s druhým anomérom teda vplyva mnoho faktorov reakcie vrátane typu katalyzátora, rozpúšťadla, teploty, koncentrácie atď., avšak kľúčové môžu byť aj protektívne skupiny sacharidu. Pre riadenie stereochemie glykozylačnej reakcie je preto možné využiť tzv. participujúcu susednú skupinu, ktorej rolu väčšinou zastáva esterová chrániaca skupina na C^2 sacharidového derivátu. Jej prítomnosť má zaisťovať vznik produktu s C^1, C^2 -*trans* konfiguráciou, a to nezávisle od pôvodne použitého anoméru. Dôvodom je stabilizácia katiónu tvorbou acyloxóniového iónu, ktorý je vysoko preferovaný oproti ostatným rezonančným štruktúram, pričom k následnému ataku nukleofilu dochádza z opačnej strany (Schéma 2).

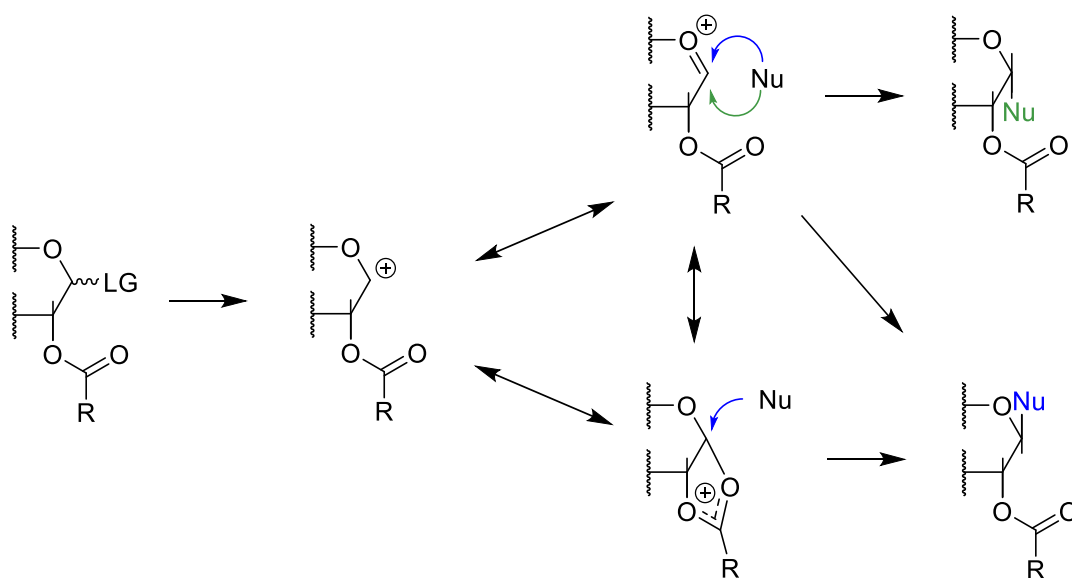


Schéma 2 Vplyv participujúcej susednej skupiny na stereochemiu glykozylácie

Tento proces sa označuje aj ako *trans*-pravidlo či Bakerovo pravidlo a zaisťuje tak vznik β -anomérov glukozidov, ribozidov, galaktózidov, xylozidov ai., zatiaľčo glykozidy manózy či arabinózy vzniknuté za týchto podmienok nesú konfiguráciu α -anoméru.

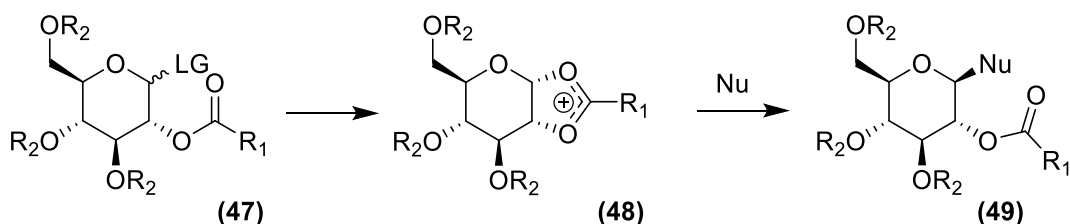


Schéma 3 Vznik 1,2-*trans*-glykozidu na príklade glukozidového derivátu

U menej reaktívnych sacharidových derivátov sa môže napriek prítomnosti participujúcej susednej skupiny tvoriť *cis*-glykozid, čo sa vysvetľuje atakom nukleofilu na oxykarbéniový kation, ktorý je reaktívnejší v porovnaní so stabilnejším acyloxóniovým kationom. Keďže schopnosť stabilizovať ióny majú taktiež polárne rozpúšťadlá, stereochemiu reakcie ovplyvňuje aj výber rozpúšťadla. Napríklad acetonitril podporuje vznik glykozidu v ekvatoriálnej polohe substituentu, pretože dokáže stabilizovať kation sacharidu tvorbou nitrilového iónu s preferovaným axiálnym usporiadaním. Naopak rozpúšťadlá éterového typu tvoria ekvatoriálny oxóniový ión a preto dávajú vznik axiálneho glykozidu.⁴⁵

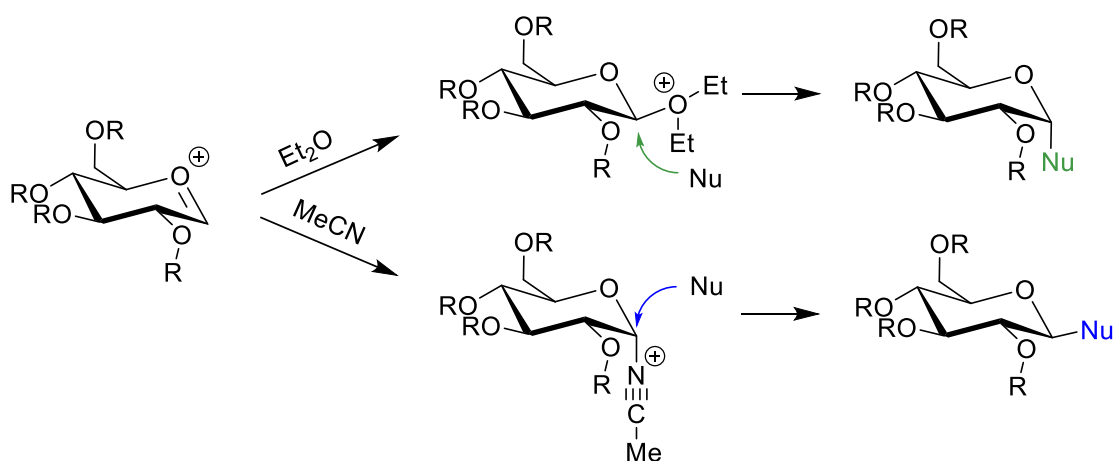


Schéma 4 Vplyv rozpúšťadla na stereochemiu na príklade glukozidového derivátu

2.2.3. Prístupy k syntéze N⁹ substituovaných purínových glykozidov

Táto kapitola sa zaoberá možnosťami tvorby N-glykozidickej väzby medzi uhlíkom C¹ sacharidu a dusíkom N⁹ purínu, čím spolu s nasledujúcou kapitolou o príprave N⁷ derivátov uceluje prehľad syntetických ciest vedúcich k purínovým glykozidom, a umožňuje tak porovnanie podmienok popísaných reakcií. Purínové N⁹ glykozidy je možné tvoriť okrem najpoužívanejších glykozylačných reakcií aj postupnou výstavbou purínového skeletu na deriváte cukru či cyklizačnými reakciami, ktoré sú však väčšinou viackrokovými syntézami s nižšími výťažkami, a preto sa k nim zväčša pristupuje až po zlyhaní reakcií glykozylačných. Spomedzi veľkého množstva dostupnej literatúry týkajúcej sa syntézy najrôznejších N⁹ purínových glykozidov je v tejto kapitole venovaná pozornosť zlomku vybraných glykozylačných reakcií, ktoré sú zaujímavé z hľadiska histórie, efektivity reakcie či rozsahu použiteľnosti. Ideálna glykozylačná reakcia je regioselektívna, tj. eliminujúca v tomto prípade nežiaduci N⁷ izomér, a zároveň stereoselektívna, tj. dávajúca vznik jedinému anoméru. Pre kritické posúdenie reakcie sú reakcie v tejto kapitole uvádzané aj s vedľajšími izomérnymi produktami, avšak len v prípadoch ich popísania či kvantifikácie v pôvodnom článku.

Jedna z najstarších metód syntézy purínových nukleozidov bola zavedená Fischerom a Helferichom a využívala soli purínov ťažkých kovov reagujúcich s vhodne chránenými C¹-halogenidmi sacharidov.⁴⁶ Reakcie boli popisované s dobrou regioselektivitou do N⁹, aj keď mechanistické štúdie viedli k zisteniu, že počiatočne dochádza ku glykozylácií na atóme N³, prípadne N⁷, a tieto produkty podliehajú transglykozylácií na termodynamicky stabilný N⁹ izomér. Nevýhodou reakcie boli mierne výťažky a stopová prítomnosť kovov, ktorá znehodnocovala výsledky biologického testovania pripravených látok.^{47,48} S úspechom boli preto využité aj sodné soli purínov, pomocou ktorých je možné pripraviť napríklad 2,6-dichlórpurín-9-β-arabino-furanozid **52** v 80% výťažku⁴⁹ či 2'-deoxyadenozín **55** v 43% výťažku⁵⁰. Nutno však podotknúť, že klasické alkylačné reakcie purínov s 1-halogenosacharidmi v prostredí báz väčšinou vedú k zmesiam N⁷ a N⁹ derivátov.^{51,52}

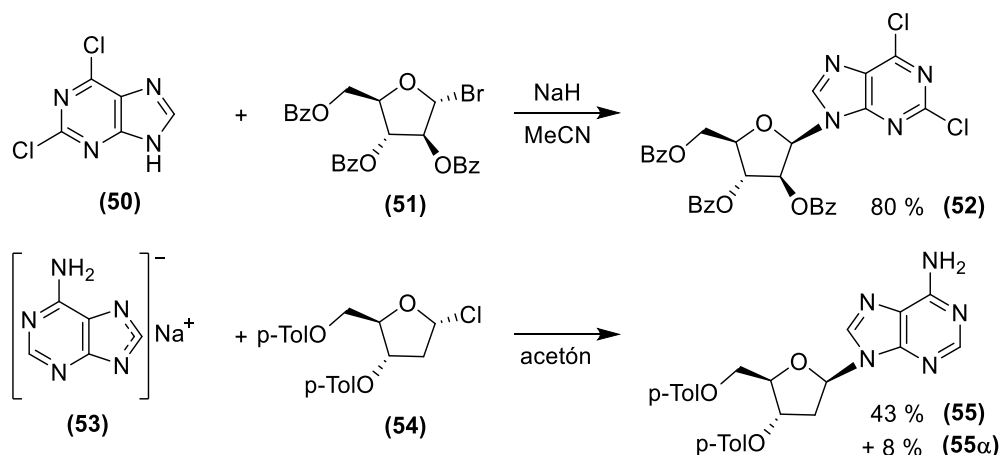


Schéma 5

Ďalšou možnosťou glykozylácie je kyslo katalyzovaná fúzna reakcia, ktorej ochotne podliehajú kyslejšie purínové deriváty, teda najmä chlórpuríny. Reakcia sa zväčša robí v tavenine peracetylovaného sacharidu s purínovým derivátom v prítomnosti Lewisových kyselín a za vákua, ktoré umožňuje posúvať priebeh reakcie odstraňovaním kyseliny octovej z reakčnej zmesi. Napríklad katalýza jódom za spomenutých podmienok poskytla po deacetylácii 40 % 6-chlórpurín-9- β -ribofuranozidu **58**, čím poskytla alternatívu chloridortuťnatej metóde, aj keď so zníženým výťažkom.⁵³ Podobný derivát, acetylovaný 2,6-dichlórpurín-9- β -ribofuranozid **59**, bol pripravený za katalýzy kyseliny *p*-toluénsulfónovej v 63% výťažku.⁵⁴

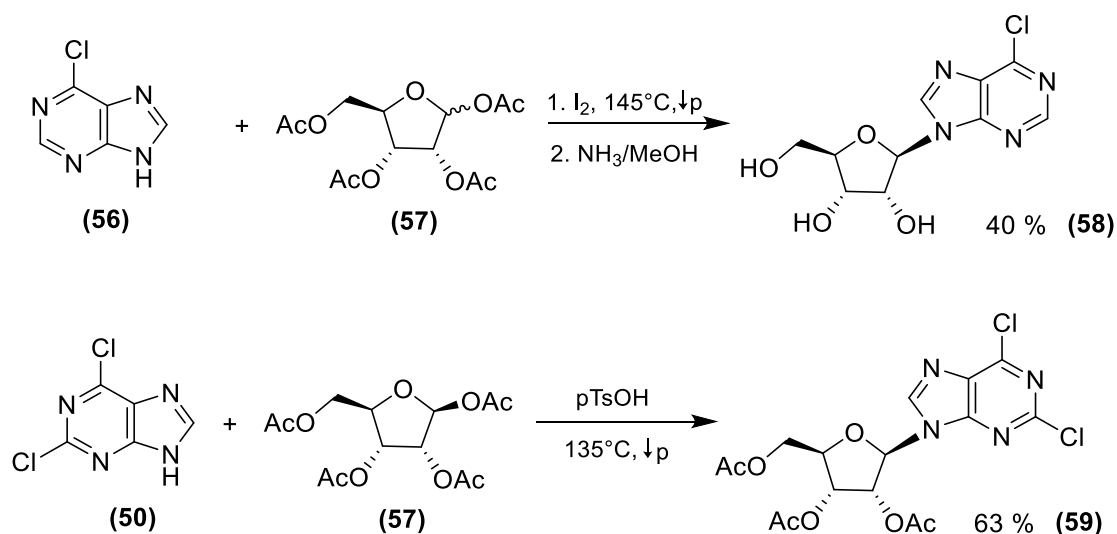


Schéma 6

Fúzna reakcia prebieha aj na samotnom puríne – s peracetylovanou ribofuranózou dáva vznik 70 % príslušného N^9 derivátu, avšak v zmesi s 20 % derivátu N^7 . Rovnaká reakcia s peracetylovanou glukózou však poskytla len 8,4 % N^9 -glukozidu.⁵⁵ Syntézou guanínových glykozidov fúznou reakciou sa zaoberali Iwamura et al., ktorí pozorovali, že anomérna konfigurácia peracetylovaného sacharidu, ani obmena katalyzátora nemali značný vplyv na výsledok reakcie a dospeli k záveru, že výsledok reakcie za študovaných podmienok je závislý od použitého purínového derivátu.⁵⁶ V reakciách popísali vznik zmesí N^9 a N^7 izomérov N^2 -acetylguanínu v celkovom výťažku 39 – 58 % a s relatívne konštantným pomerom $N^9:N^7$ 60:40 až 55:45 zachovaným pre ribozidový, xylozidový aj glukozidový derivát. Zaujímavým, aj keď nie ojedinelým zistením je schopnosť produktov podliehať N-N migrácii glykozylu, ku ktorej dochádza pri vystavení produktov fúznym podmienkam v prítomnosti bis-(*p*-nitrofenyl)fosfátu ako katalyzátora. Získaný podiel N^9 a N^7 glykozidov bol podobný vyššie spomenutému podielu po reakcii, čo naznačuje ustavenie rovnováhy medzi týmito glykozidmi.

Vedúce postavenie v syntéze purínových, ale aj pyrimidínových glykozidov majú silylačné glykozylačné reakcie, a to predovšetkým v podobe zavedenej Vorbrüggenom. Využitie silylovaných purínových báz po prvýkrát popísal Birkofer,⁵⁷ pričom šlo o reakciu 1-halogenosacharidu so silylovaným purínovým derivátom za katalýzy ortuťnatými alebo striebornými soľami. Ďalším pokrokom bola práve Vorbrüggenova modifikácia, v ktorej sa vyhlo teplotne nestabilným halogenosacharidom, namiesto ktorých sú používané peracetylované sacharidy. Zároveň boli nahradené toxické katalyzátory za Lewisove kyseliny, z ktorých najviac dominuje trimetylsilyltriflát (TMSOTf), ale aj SnCl₄ či TiCl₄. Zavedenie trimetylsilylových skupín na purín so sebou nesie významné výhody. Zvýšenie lipofily a tým aj rozpustnosti umožňuje uskutočniť reakciu v homogénnej fáze a reakciu so sacharidom podporuje aj zvýšená nukleofilita atómu dusíka vďaka elektrón-donorným vlastnostiam silylovej skupiny.^{47,48} Na výsledok reakcie Vorbrüggenovej glykozylácie často silne vplýva zmena akéhokoľvek faktoru reakcie, vrátane štruktúry reagujúceho purínu a sacharidu, rozpúšťadla a koncentrácie zložiek, teploty, katalyzátora ai. Táto nevyspytateľnosť reakcie poskytuje možnosť ladit' reakčné podmienky v závislosti od želaného purínového derivátu, keďže za využitia tejto metódy sú popísané aj reakcie za vzniku N⁷ glykozidov. Možné je však zovšeobecniť, že táto metóda poskytuje výhodnú stereoselektivitu a za zvýšenej teploty obvykle dobrú regioselektivitu na termodynamický N⁹ produkt, a aj preto si Vorbrüggenova glykozylácia našla široké uplatnenie v nukleozidovej chémii. Príkladmi využitia tejto metódy môže byť príprava benzoylovaného 6-chlórpurín-9-β-ribofuranozidu **61** za katalýzy TMSOTf v refluxujúcom acetonitrile s 94% výťažkom⁵⁸, či séria 6-chlórpurínových a 2,6-dichlórpurínových 5'-O-alkylovaných 9-β-ribofuranozidov pripravených vo výťažku 48 – 84 %.⁵⁹ Reakciu účinne urýchľuje aj mikrovlnné žiarenie, za ktorého pôsobenia bol pripravený adenosínový derivát **64**.⁶⁰

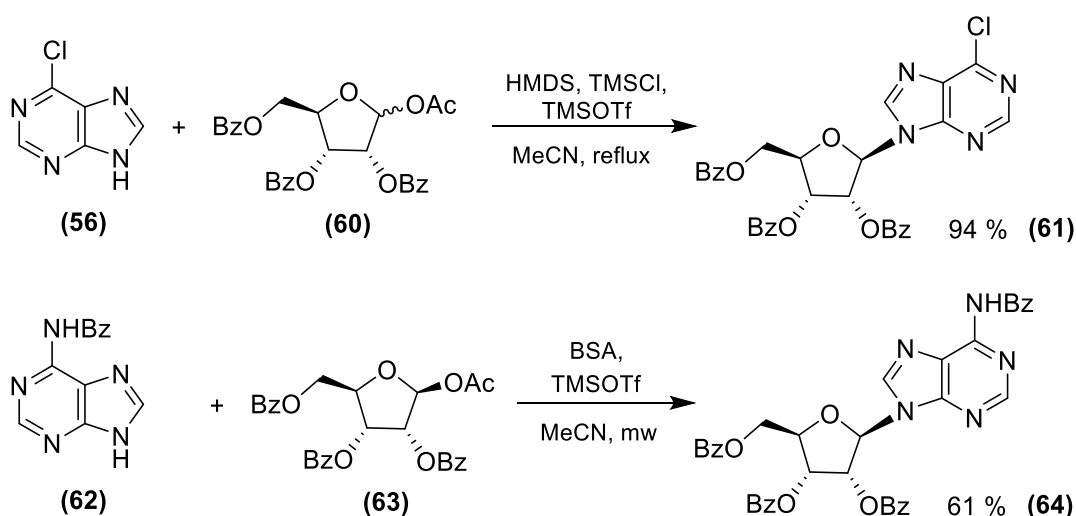


Schéma 7

Menej obvyklou možnosťou prípravy purínových N⁹ glykozidov sú tzv. transglykozylačné reakcie, kde ako glykozyl-donor vystupuje iný, zväčša pyrimidínový, nukleozid. Ide o proces využívajúci reverzibilitu glykozylačných reakcií, pričom transfer glykozylu z jednej nukleobázy na druhú je možný najmä v smere od elektrónovo chudobnejších pyrimidínových glykozidov na purínové deriváty. Transglykozylačná reakcia uskutočnená za podmienok bežne využívaných u Vorbrüggenovej syntézy poskytuje napríklad adenínový derivát **67** v 62%-nom výťažku anomérnej zmesi a za rovnakých podmienok bol získaný aj guanínový derivát **69**, kde však boli prítomné aj N⁷ izoméry.⁶¹

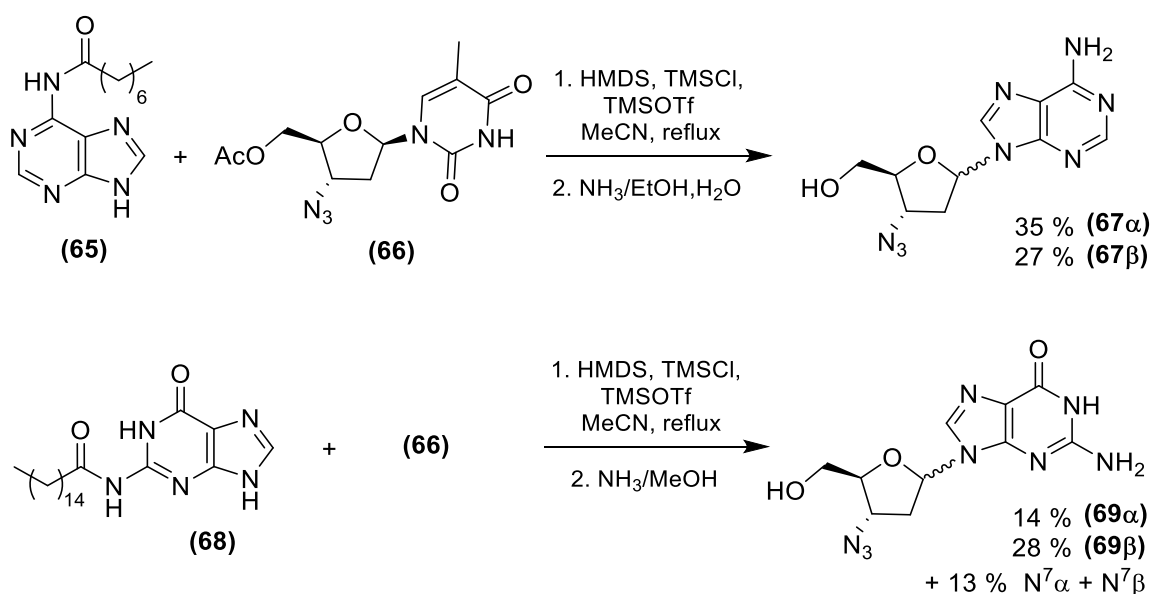


Schéma 8

Okrem klasickej katalýzy Lewisovými kyselinami môže byť transglykozylačná reakcia uskutočnená aj za pomoci katalýzy enzymatickej. Takéto biotransformácie poskytujú ešte zaujímavejšie výsledky, a to kvôli stereoselektivite, regioselektivite a efektívnosti týchto reakcií. Reakciu sprostredkujú nukleozid-fosforylázy, ktoré sú enzýmami katalyzujúcimi rovnovážnu reakciu pyrimidínového či purínového glykozidu na glykozyl-1- α -fosfát a voľnú nukleobázu a späť. To znamená, že v transglykozylačnej reakcii katalyzujú jednak disociáciu donorového glykozidu, a následne aj coupling glykozylfosfátu s purínom. Do reakcie sa za prítomnosti fosfátového pufru pridáva purín-nukleozid-fosforyláza (PNPáza), v prípade pyrimidínových donorov glykozylu aj príslušná tymidín- či uridín- fosforyláza. S výhodou úplnej anomérnej kontroly sú takto pripravované inak obtiažne dosiahnuteľné 2'-deoxy-9- β -deriváty.^{62–65} Na promiskuitu PNPázy poukazujú aj úspešné syntézy stéricky náročnejších 6-substituovaných purínových 9- β -ribozidov a ich 2'-deoxyribozidov, akými sú cytokiníny zeatíny a topolíny⁶⁶, či ribozidy s benzoxazínovým fragmentom v C⁶ substituent⁶⁷.

2.2.4. Prístupy k syntéze N⁷ substituovaných purínových glykozidov

Táto kapitola poskytuje súhrn reakcií využitých pre prípravu purínových N⁷ glykozidov a podáva prehľad o ich regioselektivitě a výťažnosti. Takejto literatúry však nie je mnoho, a zahrnuté sú preto aj publikácie zaoberajúce sa štúdiom distribúcie izomérov za rôznych podmienok reakcie a takisto reakcie, v ktorých N⁷, aj keď niekedy neželane, vznikal vo väčšom množstve. V takom prípade sa ale spravidla nejedná o všeobecne aplikovateľné metódy, keďže dané podmienky zväčša umožňujú pripraviť len konkrétny N⁷ glykozid a s inými derivátmi sa rovnaký výsledok nedosahuje. Teoretické pozadie jednotlivých typov reakcií bolo spomenuté v predošlej kapitole, tu budú diskutované predpokladané dôvody vzniku izoméru N⁷.

Priame glykozylačné metódy, tj. reakcie purínov s C¹-halogenidmi sacharidov za pôsobenia báz, vo väčšine prípadov vedú na zmes izomérov, v ktorej značne predomínuje N⁹ glykozid. Napriek tomu tieto reakcie po precíznej chromatografickej separácii umožňujú získať N⁷ derivát v miernych výťažkoch. Dôkazom môže byť príprava 2'-dideoxyribozidov 6-chlórpurínu (**56**) a 2,6-dichlórpurínu (**50**) v 11% a 13% výťažku N⁷ izoméru, za súčasného vzniku 59 % izoméru N⁹ v oboch prípadoch.⁵¹ Napriek absencii participujúcej susednej skupine vznikli len β-anoméry, čo sa pripisuje S_N2 charakteru glykozylácie sodnej soli v acetonitrile.

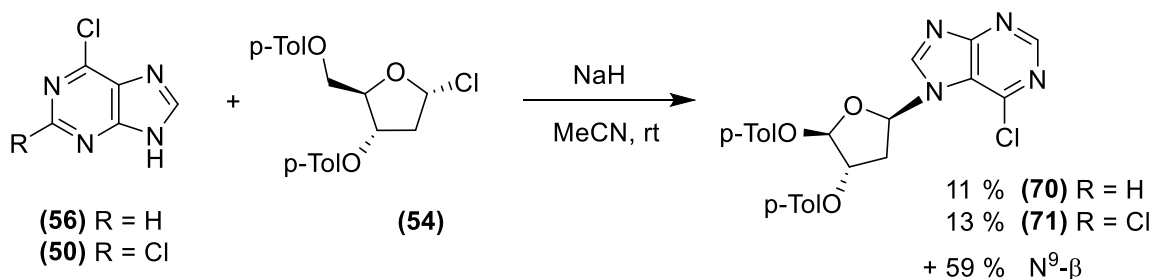


Schéma 9

Glykozylačnú reakciu sacharidu **54** s rôznymi purínmi v acetonitrile za pôsobenia NaH neskôr detailnejšie študovali ďalší autori,⁶⁸ ktorí získali odlišné výsledky u 6-chlórpurínu (3 % **70**). V reakcii zároveň detekovali aj malé množstvo α-anomérov, pričom dospeli k záveru, že sú dôsledkom anomerizácie východiskového sacharidu **54** ešte pred vstupom do reakcie, ktorej S_N2 mechanizmus potvrdili.

Zvýšeniu podielu N⁷ glukozidového derivátu v alkylačnej reakcii sa venovali Cowley et al.,⁵² pričom výsledok reakcie 6-chlórpurínu s acetobromoglukózou závisel od použitého rozpúšťadla. Najvýhodnejšia reakcia poskytujúca 14 % N⁷ izoméru spolu s 42 % N⁹ izoméru bola uskutočnená v propylénkarbonáte s K₂CO₃ ako bázou. Obmena propylénkarbonátu za DMF či DMSO spôsobila úplné potlačenie vzniku N⁷ produktu.

Neskôr bola využitá táto reakcia v jej miernej modifikácii, zahŕňala použitie acetonitrilu ako rozpúšťadla, a dosiahnutý bol zhodný výsledok ako s propylénkarbonátom.⁶⁶

Z kyslo katalyzovaných fúzných reakcií poskytujúcich N⁷ glykozid vo významnejšom množstve je možné uviesť už spomenutú reakciu purínu katalyzovanú bis-(*p*-nitrofenyl)fosfátom, ktorá s peracetylovanou ribofuranózou poskytuje 20 % N⁷ ribozidu spolu s 70 % izoméru N⁹. Reakcia však nie je všeobecne využiteľná, pretože za rovnakých podmienok s inými peracetylovanými sacharidmi k takýmto výsledkom nevedie.⁵⁵

peracetylovaný sacharid	výťažok	
	N ⁷ glykozid	N ⁹ glykozid
ribofuranóza	20 %	70 %
xylofuranóza	8,5 %	63 %
ribopyranóza	12 %	85 %
glukopyranóza	0 %	8,4 %

Tab. 1 Produkty fúznej glykozylačnej reakcie purínu za katalýzy bis-(*p*-nitrofenyl)fosfátu

Za rovnakej katalýzy neskôr kondenzovali aj N²-acetylguanín, tentoraz s celkovými výťažkami do 58 % a väčšinou takmer polovičným zastúpením N⁷ glykozidu v izomérnej zmesi s N⁹ derivátom.⁵⁶

Kvôli nízkej efektívnosti reakcií glykozytujúcich purín v jednom kroku, spadajú do úvahy pre prípravu N⁷ glykozidov aj syntézy viackrokové. Snaha obísť obtiažnu tvorbu N⁷ glykozidickej väzby na puríne viedla k skúmaniu cyklizačných metód, u ktorých sa využíva možnosť glykozylácie purínového prekursoru. Cyklizácia glykozylovaného pyrimidínového prekursoru narozdiel od jeho alkylovaného analógu zlyhávala,⁶⁹ úspešne ale cyklizácia prebieha na glykozylovanom imidazole. Takúto mnohokrokovú syntézu vychádzajúc zo 4(5)-bromo-5(4)-nitroimidazolu popísal Townsend a spolupracovníci,⁷⁰ ktorí využili pre zavedenie ribozylového derivátu na atóm N¹, teda na budúci N⁷ atóm purínu, fúznú reakciu katalyzovanú chlórctovou kyselinou. Táto ribozylácia prebehla s vysokým výťažkom 72 %, čím sa významne podieľala aj na slušnom celkovom výťažku, ktorý dosiahol 49 %. Po ribozylácii nasledovala substitúcia brómu za vznik nitrilového derivátu **74** a katalytická hydrogenácia nitroskupiny. K cyklizácii došlo reakciou s dietoxymetylacetátom a následným prídavkom amoniaku, pričom vznikol ochránený adenín-7-β-ribofuranozid (**77**). Jednotlivé kroky tejto syntézy zobrazuje Schéma 10. Podobnou cestou neskôr pripravili aj 6-tiopurín-7-β-ribofuranozid, a to prebublávaním roztoku intermediátu **76** sulfánom s následnou deacetyláciou, pričom tento produkt použili na prípravu 6-alkyltio-, 6-alkoxy a 6-alkylamino- derivátov.⁷¹

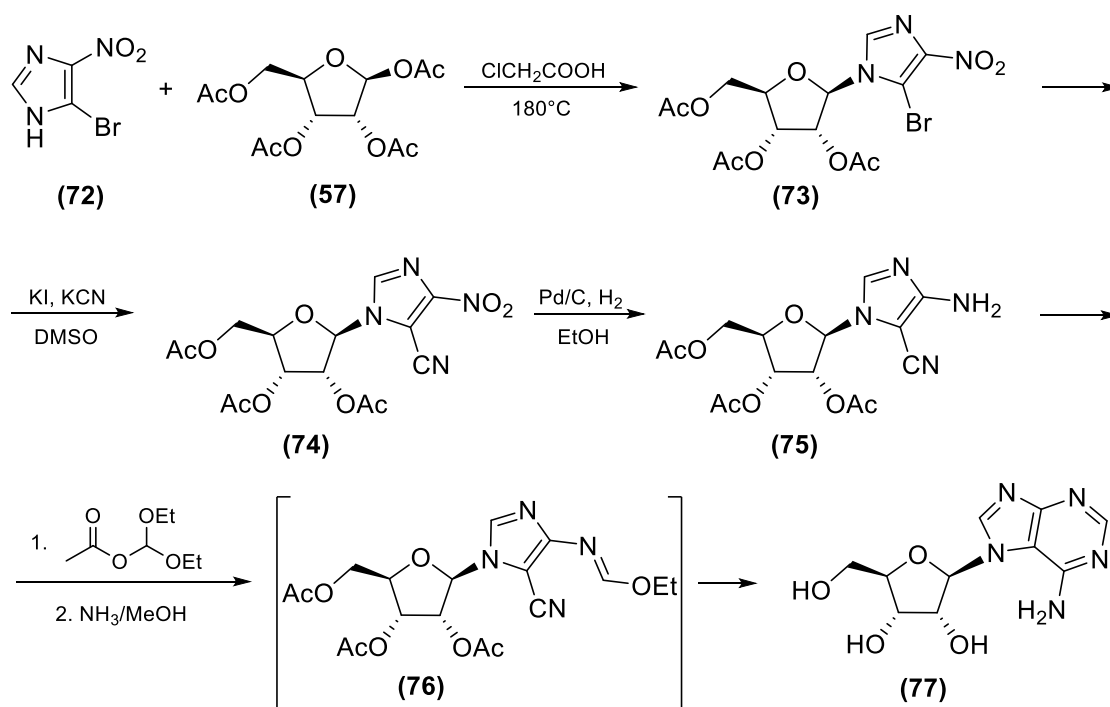


Schéma 10

Townsendovu metódu aplikovala výskumná skupina MacLeoda pri príprave 7-β-glukopyranozidov aromatických aj izoprenoidných cytokinínov.^{52,72,73} Prvá reakcia v tejto sekvencii spočívajúca v naviazaní sacharidu na imidazolový derivát však s peracetylovanou glukopyranózou neprebíhala. Riešením bola modifikácia fúznej reakcie za použitia koncentrovanej kyseliny sírovej, ktorá poskytla 26 % príslušného glukozidu. Keďže cytokiníny sú N⁶ substituované adenínové deriváty, upravená bola aj posledná reakcia. Reakciou etoxymetylénového intermediátu **78** s príslušným primárnym amínom bol získaný N¹derivát, ktorý podliehal Dimrothovmu prešmyku iniciovanému zázehvom za prítomnosti octanu benzylamónia. V prípade benzylaminopurínového derivátu **80** dosiahli celkový výťažok 15 % a zeatín-7-β-glukopyranozid (**81**) pripravili vo výťažku 11 %.

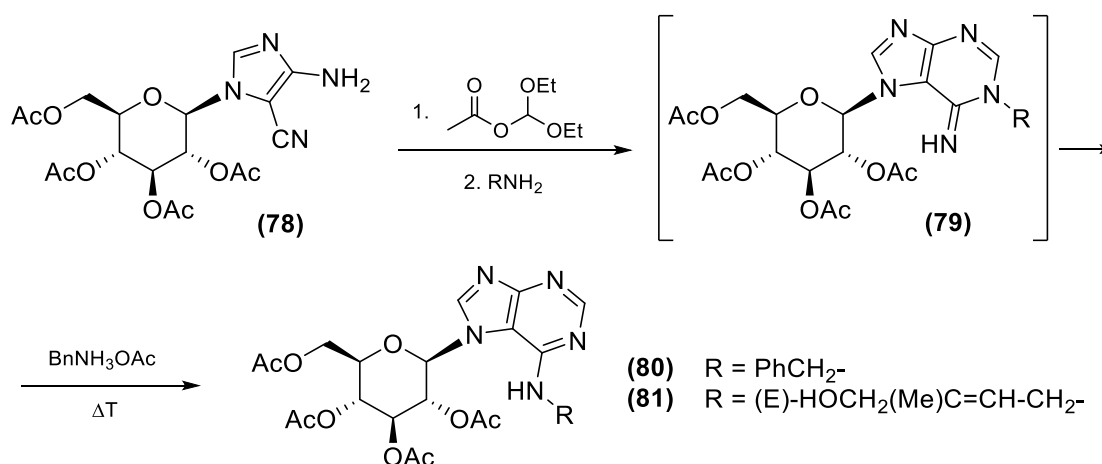


Schéma 11

Viackrokovou selektívnou metódou, aj keď aplikovanou len pre N⁷ alkylované puríny, je dômyselná reakčná sekvencia zahŕňajúca selektívnu protekciu atómu N⁹ na 6-chlórpuríne alebo inom halogénpuríne, redukciu imidazolového kruhu a alkyláciu N⁷ atómu nasledovanou deprotekciou a reoxidáciou na výsledný N⁷-alkylpurín. Tento prístup pôvodne využíval ako protektívnu skupinu benzyl alebo trityl,⁷⁴ no výhodnejšie sa neskôr ukázalo použitie *tert*-butyloxykarbonylovej skupiny, ktorá zvýšila stabilitu medziproduktov a umožnila aplikovateľnosť pre širšie spektrum substituentov.⁷⁵ Úspešne boli zavedené nielen alkyly vrátane allylových a propargylových substituentov, ale aj acylové substituenty. V zmysle Michaelovej adície reagovali aj skúmané Michael akceptory. Pripravené N⁷ substituované 6-chlórpuríny neskôr pomocou známych reakcií podrobili premene na N⁷ deriváty adenínu, guanínu, hypoxantínu a 6-merkaptopurínu.⁷⁶

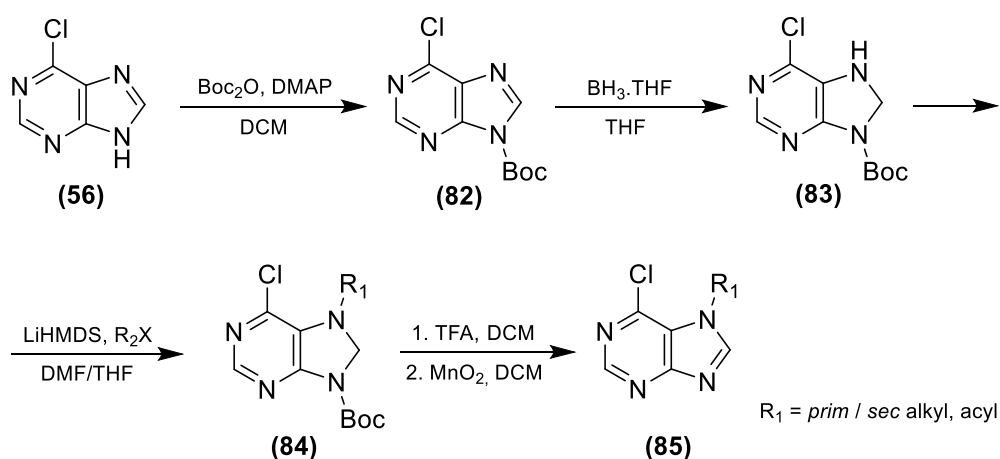


Schéma 12

Silylačné metódy, ako už bolo spomenuté v predošlej kapitole, poskytujú možnosť pripraviť vo vysokých výťažkoch a s dobrou stereo- a regio-selektivitou purínové N⁹ glykozidy. Avšak medzi popísanými silylačnými reakciami sa nájdu aj také, u ktorých sa viac či menej predvídane regioselektivita reakcie znižuje až obracia v prospech N⁷ izoméru. Žiaľ, ako bude už aj z nižšie popísaných reakcií zjavné, vzťah medzi podmienkami reakcie a distribúciou izomérov sa definuje veľmi obtiažne. Dôvodom je skutočnosť, že zdanlivo či aj úplne rovnaké podmienky reakcie z hľadiska použitého katalyzátoru, solventu či teploty s rôznymi purínovými či sacharidovými derivátmi poskytujú raz N⁷, potom N⁹ deriváty.

Jednou z reakcií silylačného typu využitých pre prípravu ústredného derivátu tejto diplomovej práce, 7-β-glukozidu 6-chlórpurínu, bola kondenzácia silylovaného 6-chlórpurínu s chránenou 1'-metylglukózou **86** za katalýzy obľúbeným TMSOTf v acetonitrile (Schéma 13). Pomocou nej bol v zmesi regioizomérov získaný N⁷ derivát **87** v 20 % výťažku.³² V prípade benzylovej protekcie šlo o anomérnu a

regioizoméru zmes štyroch látok so zachovaným 19 % výťažkom.³³ Autori podobnej reakcie s výnimkou použitia peracetylovanej glukózy reportovali 60% výťažok látky **87**,³⁶ avšak kvôli zhode poskytnutého spektra s N⁹ izomérom, je vierohodnosť tohto výsledku pochybná.

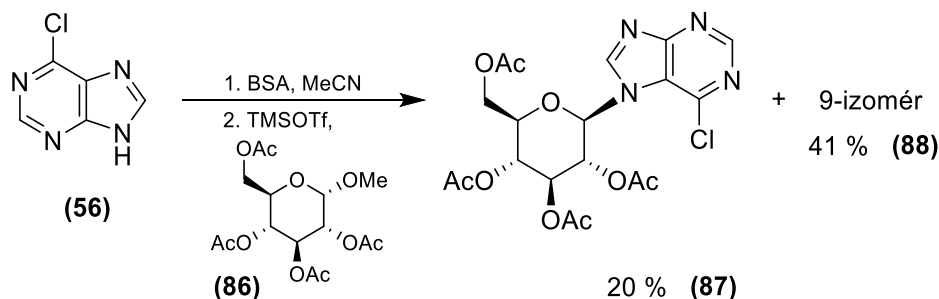


Schéma 13

Garner a Ramakanth podrobnejšie skúmali reaktivitu 2-aminopurínov s derivátmi glukózy.^{77,78} Pôvodná snaha pripraviť N⁹ glukozidy 2-aminopurínov vyvrcholila v metódu ich N⁷ regiosektívnej glukozylácie. V ich prvej publikácii študovali N²-acetylguanín, ktorý bol po silylácii glykozylovaný peracetylovanou glukózou v acetonitrile za katalýzy SnCl₄, a poskytol výlučne N⁷ glukozid (**91**) v 61% výťažku. S obmenou reakčných podmienok za benzoylovanú 1'-acetylglukózu, katalýzu TMSOTf a v refluxe dichlórétanu vznikli príslušné glukozidy v pomere N⁹/N⁷ 8:1 v 56% výťažku. Zmenou podmienok uvažovali podporu vzniku termodynamického produktu, a to aj kvôli tvorbe benzoyloxóniového katiónu s nižšou energiou v porovnaní s katiónom acetyloxóniovým. Analogické výsledky dosiahli aj u ribozylácie.

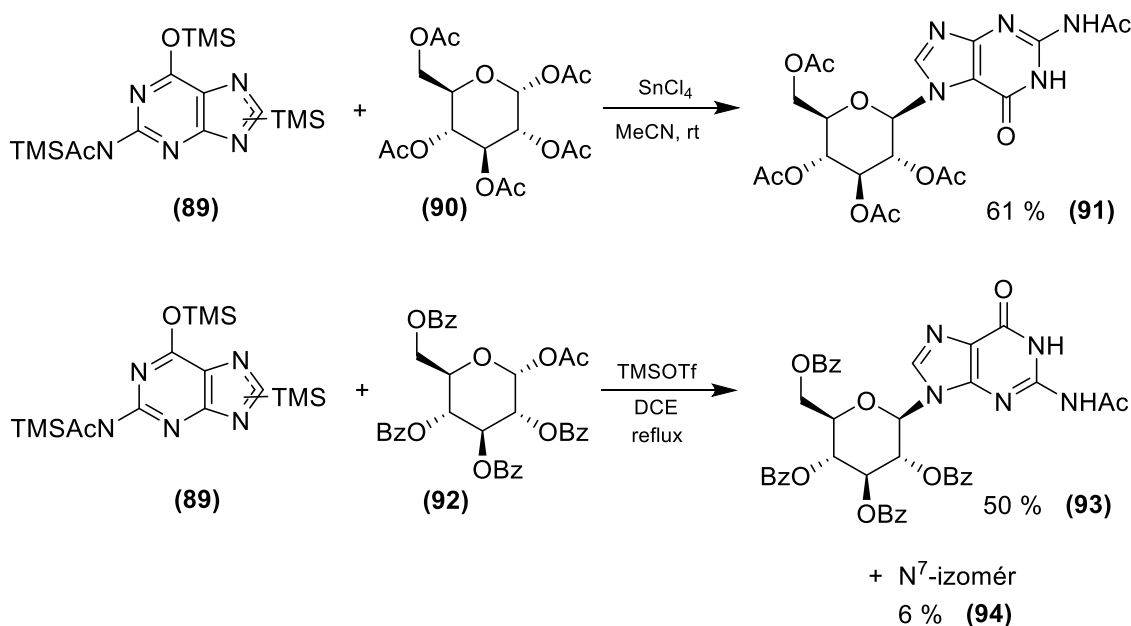


Schéma 14

Neskôr boli týmito autormi popísané glukozylácie ďalších dvoch 2-aminopurínov. Nečakane však za podmienok, kedy N²-acetylguanín poskytol N⁷ izomér ako jediný produkt, poskytol N²-acetyl-2-aminopurín výlučne N⁹ izomér v 11% výťažku. Na 2-amino-6-chlórpurín bola opäť pozorovaná výrazná dominancia N⁷ derivátu, čo poukazuje na významný vplyv substitúcie purínu. Oba študované puríny poskytli v reakcii katalyzovanej triflátom v refluxe dichlóretánu zmesi s prevládajúcim N⁹ derivátom. Prehľad týchto reakcií je súčasťou Tab. 2 (viď nižšie).

V metóde predstavenej Robinsom et al. nájdeme kombináciu vyššie uvedených podmienok.⁷⁹ Ich metóda umožňuje prípravu guanínových N⁷ pentofuranozidov ribózy, xylózy a arabinózy **95_{a-c}** v bezprecedentných výťažkoch vyše 70 %. Ide o reakciu silylovaného N²-acetylguanínu katalyzovanú pomocou SnCl₄ v dichlóretáne za laboratórnej teploty, ktorá napríklad s peracetylovanou ribózou poskytla 70 % produktu. Vplyv Lewisovej kyseliny, ako aj vplyv miernej zmeny v podobe chrániacej skupiny pre exocyklický atóm dusíka v guaníne je očividný z reakcie N²-isobutyrylguanínu za použitia TiCl₄ so značne zníženým 42% výťažkom N⁷ derivátu. Schéma 15 zobrazuje uvedené reakcie a aj ďalšiu alternatívu reakcie uskutočňovanej za katalýzy TiCl₄.

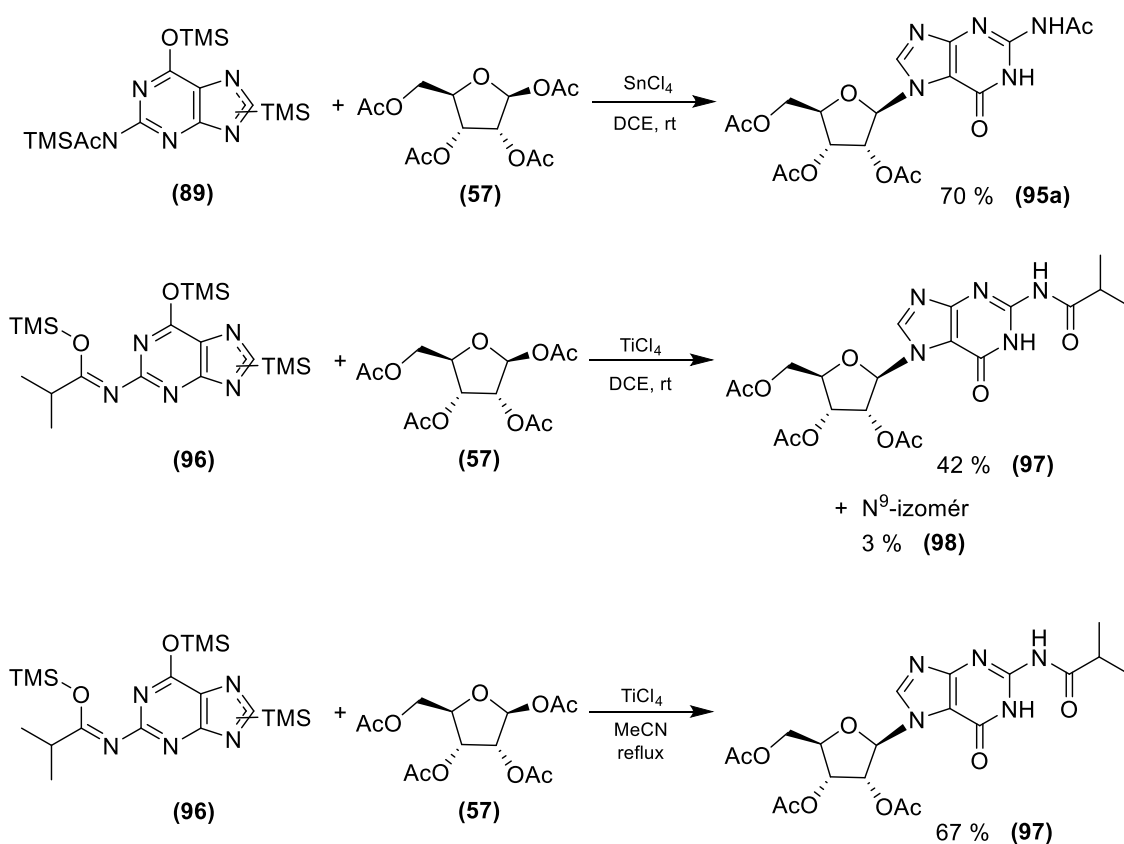


Schéma 15

Tabuľka 2 umožňuje porovnanie jednak zmienených reakcií v tejto kapitole, ale aj iných relevantných reakcií tu nerozoberaných kvôli zachovaniu čitateľnosti tohto textu. Tabuľka uvádza derivát reagujúceho purínu a sacharidu, katalyzátor, rozpúšťadlo a teplotu reakcie, zatiaľčo presné detaily napr. o pomeroch reaktantov a o použitom silylačnom činidle sú zanedbané.

purín	sacharid	LA	teplota	solvent	N ⁷	N ⁹	ref
6-chlórpurín	α-1-Me-2,3,4,6-tetraacetylglukóza	TMSOTf	↑	MeCN	20%	41%	32
6-chlórpurín	pentaacetylglukóza	TMSOTf	↑	MeCN	60%		36
6-chlórpurín	1-acetyl-2,3,5-tribenzoylribóza	TMSOTf	↑	MeCN		94%	58
N ⁶ -benzoyladenín	β-1-acetyl-2,3,5-tribenzoylribóza	TMSOTf	↑	MeCN		61%	60
N ² -acetylguanín	α-pentaacetylglukóza	TMSOTf	↑	DCE	24%	48%	77
N ² -acetylguanín	α-pentaacetylglukóza	SnCl ₄	rt	MeCN	61%		
N ² -acetylguanín	α-1-acetyl-2,3,4,6-tetrabenzoylglukóza	SnCl ₄	rt	MeCN	61%		
N ² -acetylguanín	α-1-acetyl-2,3,4,6-tetrabenzoylglukóza	TMSOTf	↑	DCE	6%	50%	
N ² -acetyl-2-aminopurín	α-pentaacetylglukóza	SnCl ₄	rt	MeCN		11%	78
N ² -acetyl-2-aminopurín	α-pentaacetylglukóza	TMSOTf	↑	DCE	2%	49%	
N ² -acetyl-2-amino-6-chlórpurín	α-pentaacetylglukóza	SnCl ₄	rt	MeCN	60%	8%	
N ² -acetyl-2-amino-6-chlórpurín	α-pentaacetylglukóza	TMSOTf	↑	DCE	11%	56%	
N ² -acetyl-2-amino-6-chlórpurín	α-6-amino-pentaacetyl-6-deoxyglukóza	SnCl ₄	rt	MeCN	9%	13%	
N ² -acetylguanín	β-tetraacetylribóza	SnCl ₄	rt	DCE	70%		79
N ² -isobutyrylguanín	β-tetraacetylribóza	TiCl ₄	rt	DCE	42%	3%	
N ² -isobutyrylguanín	β-tetraacetylribóza	TiCl ₄	↑	MeCN	67%		
N ⁶ -benzoyladenín	β-pentaacetylglukóza	SnCl ₄	↑	DCE		68%	80
N ⁶ -benzoyladenín	1,2-acetyl-3,5-di(p-nitro)benzoylxylofuranóza	SnCl ₄	rt	DCE		90%	81
N ² -lauroylguanín	1,2-acetyl-3,5-di(p-nitro)benzoylxylofuranóza	SnCl ₄	rt	DCE	37%	6%	

Tab. 2 Prehľad vybraných silylačných glykozylačných metód purínových derivátov

Už aj z uvedeného zlomku reakcií je zrejmé, že výsledok reakcie je obzvlášť citlivý na zmenu akéhokoľvek faktoru. Tento fakt zamedzuje definovaniu všeobecne platných podmienok prípravy N⁷ purínových glykozidov, a preto sú zatiaľ k dispozícii presné podmienky pre konkrétne deriváty. V závere ale možno konštatovať, že postupným vývojom metód v tejto oblasti sa k purínovým N⁷ glykozidom pozvoľna razí prístup, čím sa umožňuje počiatočné biologické skúmanie nukleozidových mimetik tohto typu.

3. Výsledky a diskusia

Najvýznamnejšou úlohou tejto diplomovej práce bolo uskutočnenie syntetickej štúdie, ktorá by v ideálnom prípade vyústila do vyvinutia metódy pre prípravu N⁷ glykozidov 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu. Táto kapitola preto podáva proces vývoja tejto metódy, interpretuje dosiahnuté výsledky a čo najkritickejšie ich hodnotí.

V práci sme sa rozhodli pre štúdium distribúcie izomérov za rôznych podmienok v metóde silylačnej, a to aj z dôvodu, že v rámci bakalárskej práce boli zbežne preskúmané a vyhodnotené rôzne prístupy vrátane priamych alkylácií, fúzných reakcií, reakcií zahŕňajúcich glykozyláciu redukovaného imidazolového kruhu a reakcií silylačného typu, pričom ako reakcia s najväčším potenciálom sa javila práve silylačná. Voľba SnCl₄ ako katalyzátora vzišla z pozorovania, že spomedzi článkov, v ktorých je zmieňované jeho použitie pri glykozyláciách purínových derivátov, sa síce výsledky líšia v závislosti od reagentov, avšak väčšinou s relatívne dobrou preferenciou do N⁹, inokedy do N⁷ produktu (viď vyššie napr. Tab. 2, resp. články ^{77–81}). Pre tento typ reakcie sme si definovali niekoľko predpokladov, ktoré zahŕňali spôsoby, ktorými by sa mohla docieľť preferencia kinetického N⁷ produktu. Pozorovaný bol vplyv rôznych faktorov na výsledok reakcie, čo zahŕňalo najprv vplyv teploty, času a rozpúšťadla, následne najmä vplyv Lewisovej kyseliny a vplyv štruktúry sacharidového derivátu. 6-Chlórpurín a 2,6-dichlórpurín boli vybraní ako látky hlavného záujmu kvôli ich možnosti transformácie na rozmanité purínové deriváty.

Reakcie boli v niektorých prípadoch vyhodnocované bez izolácie produktov, a to prostredníctvom LC-MS analýzy reakčných zmesí. K tejto aproximácii pri vyhodnocovaní bolo pristúpené z dôvodu korelácie konverzie, pomeru regioizomérov a ich množstva pri porovnaní dát z analýzy s výsledkom po starostlivej izolácii. Identita izomérov bola predbežne dedukovaná jednak na základe nižšej polarita N⁷ derivátov v porovnaní s príslušným N⁹ izomérom, ale rozlíšeniu napomáhala aj absorpčné spektrum, ktoré v prípade N⁷ derivátov siaha do 290 nm, zatiaľčo absorpcia N⁹ derivátov je už nad 275 nm minimálna až nulová.

3.1. Vplyv základných parametrov reakcie

Predpoklad o vplyve teploty a času reakcie na distribúciu regioizomérov vychádzal z teórie kineticky a termodynamicky kontrolovanej reakcie – tj., že väčšie množstvo N⁷ izoméru bude prítomné na začiatku reakcie a zároveň v reakcii vedenej za nižšej teploty. Zo solventov boli zvolené dichlóretán a acetonitril, ktoré sú zaužívanými rozpúšťadlami pre Vorbrüggenovu glykozyláciu. Základnú reakciu, na ktorej boli podmienky testované ukazuje Schéma 16. Ide o glukozyláciu silylovaného 6-chlórpurínu peracetylovanou glukózou **99**, pričom kľúčovou zložkou zaisťujúcou vznik N⁷ sa zdá byť SnCl₄.

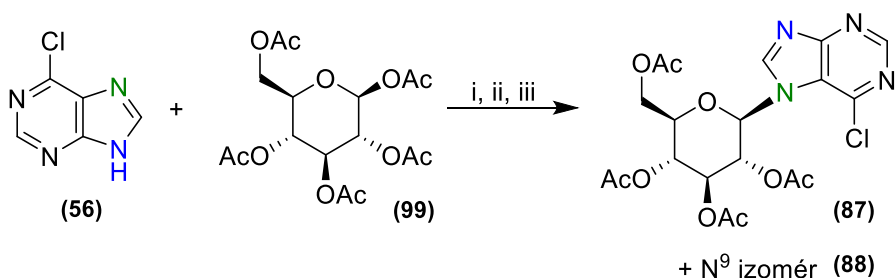


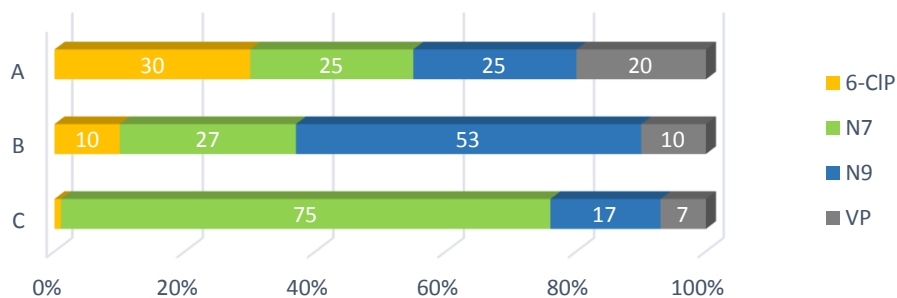
Schéma 16

- (i) 1.5 eq. BSA, 80°C, 30 min;
- (ii) 2.1 eq. SnCl₄, 0°C → r.t., 30 min
- (iii) 1.1 eq. β-GlcpAc (**99**)

Reakcia vedená v polárnom aprotickom rozpúšťadle acetonitrile poskytuje po dni miešania 70% konverziu, avšak so značným množstvom vedľajších produktov (ďalej ako „VP“) a s rovnomernou distribúciou medzi oba izoméry. Konverzia sa časom zlepšuje, ale neúmerne pribúda najmä N⁹ produkt. Dichlóretán poskytuje značne lepšie výsledky, a to úplnú konverziu s vyše štvornásobnou dominanciou N⁷ produktu. Výsledky sprehľadňuje tabuľka 3 a graf 1. Odvážne by sa dalo predpokladať, že zhoršený pomer je dôsledkom schopnosti acetonitrilu stabilizovať acyloxóniový kation sacharidu a tým znížiť jeho reaktivitu, čím dôjde k prednostnému vzniku termodynamického N⁹ produktu.

Solvent	Teplota	Čas	N ⁷ /N ⁹	konverzia	VP	stĺpec
MeCN	r.t.	22 h	1	70 %	20 %	A
		72 h	0,5	90 %	10 %	B
DCE	r.t.	22 h	4,4	99 %	7 %	C

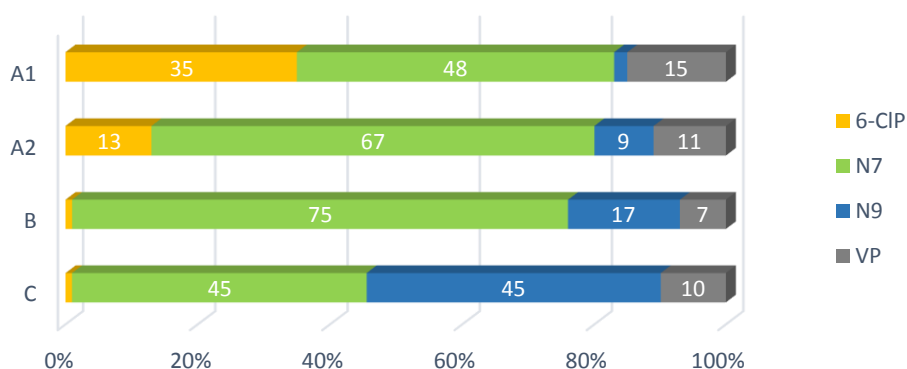
Tab. 3 Vplyv rozpúšťadla na reakciu



Graf 1 Vplyv rozpúšťadla na reakciu

Aj teplota má v tejto reakcii významný, no očakávaný vplyv. Za refluxu sa dosiahne úplná konverzia už po dvoch hodinách, avšak aj napriek zachovanej prítomnosti SnCl_4 sa množstvo N^9 už vyrovná množstvu N^7 glukozidu. Znížená teplota zase pôsobí na podiel N^7/N^9 priaznivo, avšak rýchlosť reakcie je značne spomalená. Zvýšením ekvivalentu reagujúceho sacharidu sa konverzia do želaného produktu zvýši len nevýznamne a spôsobí navýšenie množstva vedľajších produktov. Výhodou reakcie vedenej v chlade je jednoduchšia izolácia produktu z inak ťažko separovateľnej izomérnej zmesi.

Solvent	Teplota	Čas	N^7/N^9	konverzia	VP	stípec
DCE	6°C	22 h	minimum N^9	65 %	15 %	A ₁
		8 d	7,4	87 %	11 %	A ₂
	r.t.	22 h	4,4	99 %	7 %	B
	reflux	2 h	1	99 %	10 %	C



Tab. 4, Graf 2 Vplyv teploty na reakciu

Že ide o rovnovážnu reakciu potvrdilo pozorovanie reakcií s niektorými sacharidmi, kde prvotne vzniknuté množstvo N⁷ izoméru v čase detekovateľne ubúdalo a N⁷/N⁹ pomer sa znižoval. Trend bol pozorovaný napr. u reakcií 6-chlórpurínu s peracetylovaným galaktozidom **57** a ribozidom **113**. Z týchto pozorovaní vyplynulo, že optimálny reakčný čas je kompromisom medzi čím vyššou konverziou východiskových látok a čím lepším pomerom N⁷ a N⁹ derivátov. To znamená, čo najdlhší reakčný čas z hľadiska konverzie, no zároveň čo najkratší kvôli zachyteniu kinetického produktu.

Zaujímavým zistením bolo pozorovanie reakcie N⁷ glukozidu **87**, ktorý poskytol v dichlóretáne po dvoch hodinách zahrievania s TMSOTf ako Lewisovou kyselinou zmes s jeho N⁹ izomérom **88**. To znova potvrdzuje možnosť transglykozylačnej reakcie, pričom preferovaným produktom je produkt termodynamický.

Glykozylačná reakcia bola pôvodne pred separáciou spracovávaná prídavkom metanolu a následne extrahovaná. Avšak pri ukončovaní reakcie metanolom bol pozorovaný vznik 6-metoxy **122** a triacetátového derivátu **121** (Schéma 17). Aj keď išlo len o jednotky percent, konkurenčná substitúcia a monodeacetylácia bola potlačená náhradou metanolu za isopropanol.

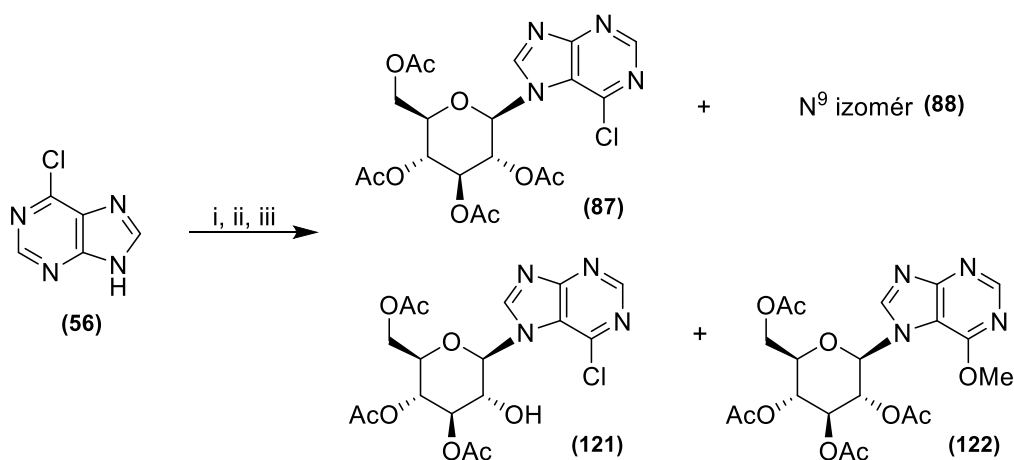


Schéma 17

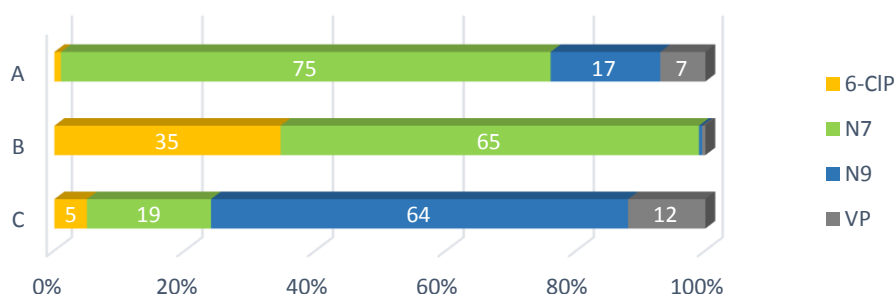
- (i) 1.5 eq. BSA, 80°C, 30 min;
- (ii) 2.1 eq. SnCl₄, 0°C → r.t., 30 min
- (iii) 1.1 eq. β-GlcpAc (**99**), 24 h
- (iv) MeOH

Nutné je zároveň zmieniť, že výťažok glykozylácie je značne znížený v prípade použitia starších činidiel (najmä BSA), ako aj pri nedokonale suchom rozpúšťadle či atmosfére.

3.2. Vplyv Lewisovej kyseliny

Už zo zbežného porovnania študovanej reakcie voči podmienkam klasickej Vorbrüggenovej reakcie poskytujúcej N⁹ deriváty je zrejmé, že typ Lewisovej kyseliny má na regioselektivitu glykozylácie zásadný vplyv. Často používaný TMSOTf poskytuje za skúmaných podmienok konverziu až pri zvýšenej teplote a za takmer výhradnej tvorby N⁹ glukozidu, takisto ako aj BF₃.Et₂O a BF₂OTf.OEt₂, ktorý je komplexom generovaným kombináciou dvoch predchádzajúcich LA. Katalýza FeCl₃ vedie majoritne na N⁹ izomér, zatiaľčo s AlCl₃, ZnCl₂, MgCl₂, ani s Ti(iPrO)₄ reakcia neprebíha. Rozhodujúcim experimentom bola reakcia katalyzovaná TiCl₄, ktorá poskytla výlučne N⁷ produkt s 60 až 70% konverziou 6-chlórpurínu.

Solvent	Teplota	LA	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	VP	stĺpec
DCE	r.t.	SnCl ₄	4,4	99 %	7 %	A
		TiCl ₄	N ⁷ only	60–70 %		B
		FeCl ₃	0,3	95 %	12 %	C



Tab. 5, Graf 3

Vplyv Lewisovej kyseliny na reakciu

Pri reakciách za katalýzy SnCl₄ a TiCl₄ poskytujúcich najvhodnejšie výsledky bol sledovaný vplyv ich množstva v reakcii. Pre tieto Lewisove kyseliny sa uvažuje dvojité pôsobenie, jednak tvorba kationu zo sacharidu a zároveň komplexácia LA s purínovým derivátom. Tvorba σ-komplexu závisí najmä od acidity Lewisovej kyseliny, pričom napr. pre silné LA ako je SnCl₄ sa udáva pre kvantitatívnu tvorbu komplexu so silylovaným 5-metoxyuracilom len jeden ekvivalent, zatiaľčo u TMSOTf je to päť.⁴⁸ Spotreba istého množstva LA v tejto interakcii je jeden z dôvodov štandardného použitia 2.1 ekvivalenta SnCl₄ či TiCl₄ voči purínovému derivátu, pričom podobné množstvá sa objavujú aj v literatúre. Zvýšenie množstva až na 4.2 ekvivalenta však v oboch prípadoch viedlo k potlačeniu konverzie, aj keď za zachovania distribúcie izomérov.

Výsledok dosiahnutý za podmienok katalýzy TiCl_4 je prvou regioselektívnou reakciou vedúcou na N⁷ glukozid 6-chlórpurínu. V snahe zvýšiť neúplnú konverziu 6-chlórpurínu v tejto reakcii boli uskutočnené viaceré experimenty:

Nadbytok sacharidového derivátu (1.5 ekv.) síce o pár jednotiek percent zvýši konverziu, no prítomnosť nezreagovanej peracetylovanej glukózy, ktorú z reakčnej zmesi nie je možné narozdiel od nezreagovaného 6-chlórpurínu vyextrahovať, zamedzuje prvotne zvažovanú možnosť vyhnúť sa kolónovej chromatografii. Myšlienka premeniť nezreagovaný sacharid na polárny glykozid a tým ho odstrániť extrakciou po glykozylačnej reakcii sa ukázala z prvotných experimentov ako neuskutočniteľná a nebola ďalej rozpracovávaná. V rámci spomenutej myšlienky boli skúšané reakcie peracetylovanej glukózy s viacerými polárnymi alkoholmi (glycerol, kyselina vínna ai.) za podmienok glykozylačnej reakcie (Schéma 18), avšak bez využiteľnosti kvôli nedostatočnému spolárneniu či nereaktivite za daných podmienok.

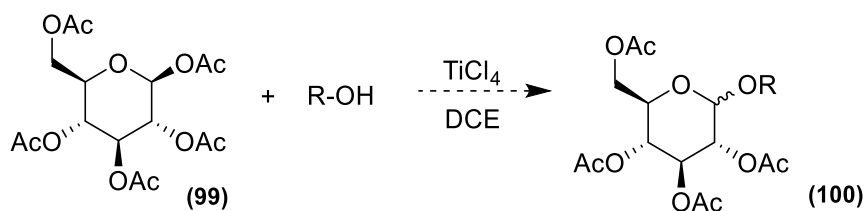


Schéma 18 Reakcia peracetylovanej glukózy (99) s alkoholmi za glykozylačných podmienok

Ďalším pokusom zvýšiť konverziu bolo prevedenie reakčnej zmesi zo suspenzie do roztoku. Nariedenie dichlóretánom rozpusteniu zložiek nepomohlo, a zatiaľčo po prídavku acetonitrilu reakcia prebieha v roztoku, glykozylácia je obmedzená.

Ako vhodná sa v niektorých glykozyláciách popisovala kombinácia 1 ekvivalentu SnCl_4 , ktorý interaguje s purínovým derivátom, a malého množstva TMSOTf tvoriaceho acyloxóniový kation sacharidu.⁴⁸ V nami študovanej reakcii však kombinácia TiCl_4 a SnCl_4 reakciu neovplyvnila.

Zvýšenie teploty reakciu „iba“ urýchľuje. To znamená, že vo výsledku sa konverzia nezvýši, ale rovnováha sa ustaví skôr. Reakciu tak možno s rovnakým výsledkom skrátiť z 24 hodín na 2 hodiny, pokiaľ je vedená pri 40°C. Pri ešte vyššej teplote, 70°C, sa už dosahuje výťažok glykozylácie mierne nižší. Čo je však prekvapivé, katalýza TiCl_4 narozdiel od SnCl_4 dokonca zachováva N⁷ regioselektivitu aj pri týchto teplotách.

3.3. Vplyv štruktúry glykozyldonoru

Táto podkapitola pokrýva viaceré experimenty, ktoré zahŕňali pozorovanie vplyvu typu anoméru reagujúceho sacharidu, vplyvu charakteru odstupujúcej skupiny, ako aj vplyvu protektívnej skupiny na C². Zahnutá je takisto reaktivita rôznych sacharidov, z ktorých boli študované najmä ribóza, glukozamín, galaktóza ai.

3.3.1. Vplyv protektívnych skupín glykozyldonoru

Úvaha, že stabilita a s tým súvisiaca reaktivita acyloxóniového katiónu sa môže významne podieľať na ovplyvnení pomeru kinetického a termodynamického produktu, viedla k modifikácii štruktúry sacharidu. Pre ovplyvnenie stability katiónu sacharidu je nutné zmeniť acylovú chrániacu skupinu pre hydroxyl na C², ktorá stabilizáciu umožňuje. Naším predpokladom bolo, že zvýšenie reaktivity katiónu, bude viesť k prednostnej tvorbe kinetického N⁷ produktu. Pre overenie tejto hypotézy bolo cieľom nahradiť doteraz využívaný acetyl, ktorý sa zároveň pre tieto reakcie stal referenčnou skupinou umožňujúcou porovnanie distribúcie izomérov. Trifluóracetyl a *para*-nitrobenzoyl boli skupinami, u ktorých bolo uvažované pôsobenie v prospech N⁷ produktu. Benzoylová skupina reprezentovala skupinu znižujúcu reaktivitu katiónu, apriori teda pôsobiaca v prospech N⁹ izoméru. Študovanou reakciou stále zostala glykozylácia katalyzovaná SnCl₄ (viď Schéma 16, s. 38) a popri nej bola paralelne študovaná aj reakcia za katalýzy TiCl₄.

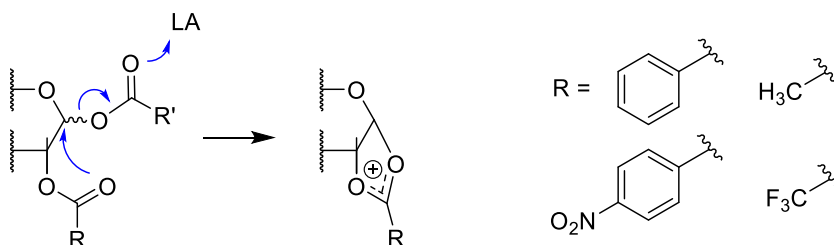


Schéma 19

Skutočne, v analogickej reakcii derivátu ribózy nesúceho 2'-O-benzoyl sa pomer N⁷/N⁹ v porovnaní voči reakcii s peracetylovanou ribózou výrazne zhoršil, pričom u študovanej reakcie katalyzovanej TiCl₄ došlo takmer k úplnému potlačeniu vzniku N⁷ (Tab. 6).

Der. sacharidu	R	LA	N ⁷ /N ⁹	Konverzia
	Ac-	SnCl ₄	1,4	90 %
	Bz-		1	75 %
	Ac-	TiCl ₄	6,6	75 %
	Bz-		< 0,1	95 %

Tab. 6 Porovnanie výsledkov reakcií peracetylovanej a perbenzoylovanej ribózy

Glykozylácia s analogickým glukózovým derivátom **92** bola za katalýzy TiCl_4 vyhodnotená taktiež ako reakcia poskytujúca N^9 izomér, pričom izomér bol stotožnený prostým porovnaním absorpčného UV spektra so zhodnými produktmi v ďalšej reakcii (glykozylácia so **102**). Syntetická cesta na derivát **92** bola zložená z popísaných reakcií benzoylácie glukózy⁸², selektívnej deprotektie⁸³ a acetylácie voľného anomérneho hydroxyly⁸⁴ (Schéma 20). Ako substrát pre glykozyláciu bola využitá aj perbenzoylovaná glukóza (**102**), ktorá do tejto reakcie vstupuje v porovnaní s derivátom **92** s odlišnou odstupujúcou skupinou a aj anomérom. Faktom však je, že výsledok reakcie je závislý aj od týchto faktorov a niektoré s týmto spojené pozorovania sú uvedené nižšie. V glykozylačnej reakcii s perbenzoátom **102** katalyzovanej SnCl_4 vznikal príslušný N^7 glukozid už „len“ v dvojnásobnom nadbytku, zatiaľčo katalýza TiCl_4 zachovala výlučnú tvorbu N^7 izoméru aj v tomto prípade.

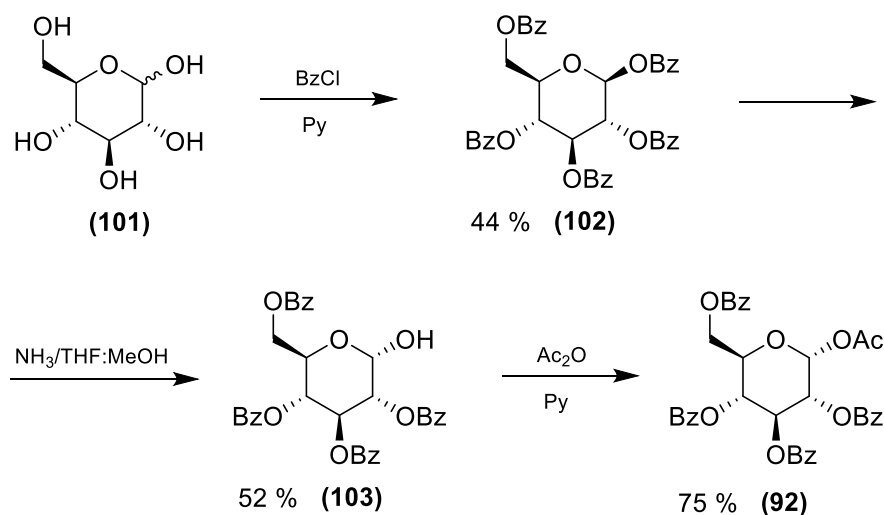


Schéma 20 Príprava 1-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glukopyranózy (**92**)

Ďalším krokom na ceste k odhaleniu vplyvu chrániacej skupiny na C^2 bola príprava esterov trifluóroctovej a *para*-nitrobenzoovej kyseliny. Derivát **105** bol pripravený reakciou glukózy s *p*-nitrobenzoylchloridom v pyridíne.

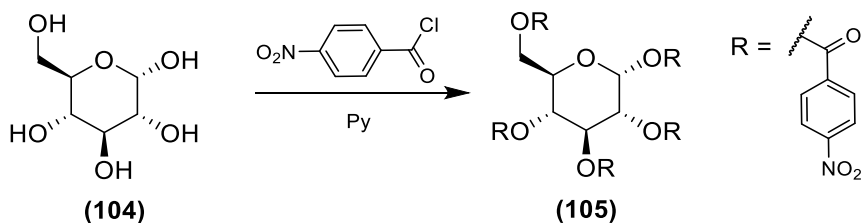


Schéma 21 Príprava 1,2,3,4,6-penta-O-(4-nitrobenzoyl)- α -D-glukopyranózy (**105**)

Za použitia derivátu **105** v skúšanej glykozylačnej reakcii katalyzovanej SnCl_4 bol pozorovaný vznik troch izomérnych produktov len v malom množstve a to až po niekoľkodňovom zahrievaní pri 74°C .

Trifluóracetylovaná glukóza (**106**) bola pripravená podľa popísanej reakcie glukózy s čerstvo predestilovaným trifluóracetanhydridom v pyridíne.⁸⁵ Produkt bol následne destilovaný za vákuu 0,062 Torr pri teplote 115°C s výťažkom 78 %. Kvôli vysokej citlivosti produktu na hydrolýzu bolo po celý čas zaobchádzania zabraňované kontaktu s vlhkosťou a aj skladovaný bol vo forme zásobného roztoku v dichlóretáne pod argónom. Pripravený trifluoracetát **106** však v študovaných glykozylačných reakciách neposkytol žiadnu konverziu na želaný produkt. V snahe zistiť vplyv na distribúciu izomérov boli skúšané viaceré obmeny, vrátane zvýšenia množstva glukozidového derivátu **106** v reakcii, katalýza slabšou Lewisovou kyselinou TMSOTf, ako aj reakcia bez prítomnosti LA kvôli novej deprotekcii trifluoracetylu a beztak vysokej reaktivity glukózového derivátu. V žiadnej reakcii konverzia na N⁷ či N⁹ glukozid nebola dosiahnutá. Rovnaký výsledok poskytla aj reakcia nesilylovaného 6-chlórpurínu za katalýzy TMSOTf v prítomnosti DBU, ktorá v bežnom prevedení s peracetylovanou ribózou vedie na príslušný N⁹ ribozid.⁸⁶

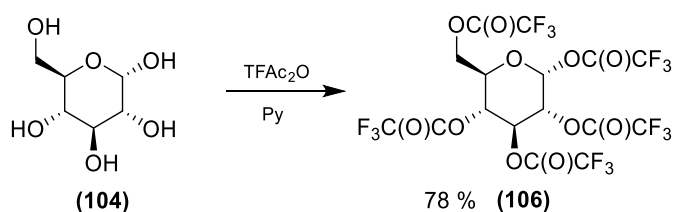


Schéma 22 Priprava 1,2,3,4,6-penta-O-trifluoracetyl- α -D-glukopyranózy (**106**)

S neúspechom u trifluóracetylovanej glukózy sme sa presunuli na N-trifluoracetyláciu glukozamínu, čo sa ukázalo ako vhodný krok. U peracetylovaného glukozamínu totiž narozdiel od iných peracetylovaných monosacharidov (galaktózy, manózy, ribózy a xylózy) dochádzalo len k minimálnej konverzii, aj to až po zahriatí reakcií (viď Tab. 7). K obmedzenej premene na aminoglukozid 6-chlórpurínu (**56**) dochádzalo za použitia ako α -anoméru (**107**), tak aj β - anoméru (**108**). Rôzna reaktivita anomérov peracetylovaného glukozamínu bola reportovaná aj v iných reakciách.⁸⁷

Der. sacharidu	LA	Teplota	čas	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	stípec
 (107)	SnCl ₄	r.t.	1 d		-	
		74°C	2 h	0,5	30 %	A
	TiCl ₄	r.t.	1 d		-	
		74°C	2 h	7	15 %	B
 (108)	SnCl ₄	r.t.	1 d		-	
		74°C	12 h		-	
	TiCl ₄	r.t.	1 d		-	
		74°C	12 h	1,5	25 %	C

Tab. 7 Výsledky glykozylačných reakcií peracetylovaného glukozamínu

Kvôli obmedzenej reaktivite peracetylovaného glukozamínu za podmienok nádejne sa vyvíjajúcej glykozylačnej metódy sme pristúpili k príprave glukozamínu **111**. Jeho príprava zahŕňala najprv selektívne zavedenie trifluóracetylu na NH₂ skupinu uhlíka C² a následne acetyláciu hydroxyskupín, ktorá poskytla zmes anomérov (Schéma 23).^{88,89}

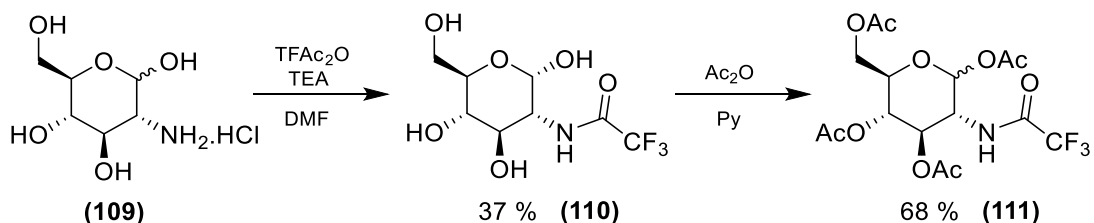
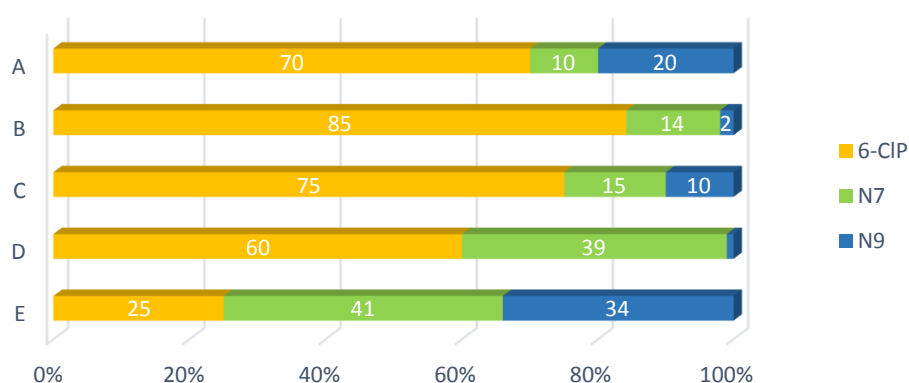


Schéma 23 Príprava 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoracetamido-D-glukopyranózy

Glykozylačná reakcia N-trifluóracetylovaného derivátu **111** so silylovaným 6-chlórpurínom katalyzovaná SnCl₄ už poskytla 39 % príslušného N⁷ aminoglukozidu **136** s detekovateľným malým množstvom N⁹ izoméru. Zahriatie očakávané pôsobilo nepriaznivo, napomohlo ďalšej konverzii 6-chlórpurínu, avšak takmer výlučne do N⁹ izoméru. Katalýza TiCl₄ sa v tomto prípade neosvedčila (Tabuľka 7 - pokračovanie). Výsledky dosiahnuté s glukozamínovými derivátmi pre prehľadnosť zobrazuje Graf 4.

Der. sacharidu	LA	Teplota	čas	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	stĺpec
 (111)	SnCl ₄	r.t.	1 d	minimum N ⁹	40 %	D
		74°C	2 h	1,2	75 %	E
	TiCl ₄	r.t.	1 d		-	
		74°C	2 h		-	

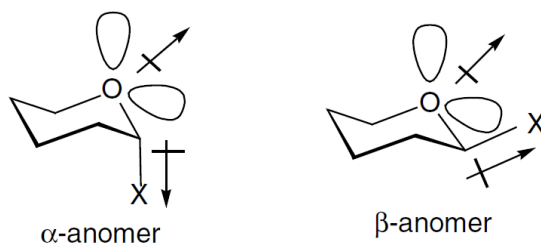


Tab. 7 – pokračovanie, Graf 4

Nepriaznivý vplyv acylu so stabilizujúcimi vlastnosťami a priaznivý vplyv elektrónakceptorných acylov bol v niektorých prípadoch potvrdený, no bohužiaľ u viacerých reakcií zhodnotenie vplyvu na pomer N⁷/N⁹ nebolo možné kvôli nereaktivite sacharidového derivátu so silylovaným 6-chlórpurínom za študovaných podmienok.

3.3.2. Vplyv anomérnej konfigurácie glykozyl donoru

Rôzna reaktivita anomérov, ktorú sme pozorovali u peracetylovaného glukozamínu **107** a **108** (kap. 3.3.1.), nás primäla k preskúmaniu vplyvu anomérnej konfigurácie na reakciu, ktorý sme predtým ešte neuvažovali. Porovnané preto boli aj reakcie β - a α -anoméru peracetylovanej glukózy, pričom výsledkom pozorovania bola znížená reaktivita α -anoméru – za katalýzy SnCl_4 sa znížila konverzia na 80 % bez ovplyvnenia distribúcie izomérov, za katalýzy TiCl_4 reakcia neprebiehala. Odôvodnenie všeobecne platným pravidlom vyššej reaktivity axiálnych substituentov spôsobenej ich nevýhodnými stérickými podmienkami v porovnaní so substituentami ekvatoriálnymi, by v tomto prípade bolo v rozpore s našim zistením, keďže axiálnym substituentom je v glukopyranóze α -anomér. U anomérnych hydroxy skupín (resp. iných substituentov viazaných cez elektronegatívny atóm) totiž hrá významnú rolu tzv. anomérny efekt. Ten sa vysvetľuje nevýhodnou interakciou dipólov voľných elektrónových párov endocyklického kyslíka s dipólom tvoreným polarizovanou väzbou anomérneho uhlíka s elektronegatívnym atómom substituenta, ku ktorej dochádza u β -anomérov (Obr. 19).^{45,90}



Obr. 19 Dipólové momenty v 4C_1 konformácii α - a β -anomérov (prevzaté z ⁴⁵)

Táto interakcia zvyšuje energiu ekvatoriálne orientovaného β -anoméru natoľko, že energeticky stabilnejším anomérom je anomér α . Zvýšená reaktivita β -anomérov u derivátov glukózy by mala byť preto spôsobená týmto efektom.⁹¹

Anomérny efekt je zároveň aj dôvodom obtiažnejšej prípravy čistých β -anomérov, keďže väčšina acylačných reakcií pyranóz vedie na stabilnejší α -anomér, príp. na ich zmes, ktorú je v niektorých prípadoch možné oddeliť ich postupnou kryštalizáciou. Príprava α -anoméru peracetylovaného glukozamínu (**107**) nasledovala článok,⁹² kde išlo o acetyláciu v pyridíne za laboratórnej teploty. V snahe pripraviť anomér β (**108**) bol nasledovaný patent,⁹³ v ktorom acetylácia prebiehala v pyridíne za zvýšenej teploty, avšak reprodukciou tohto postupu bol prvou kryštalizáciou získaný α -anomér a až ďalšou kryštalizáciou aj isté množstvo želaného anoméru. Výlučnú tvorbu β -anoméru peracetylovaného glukozamínu (**108**) nakoniec zaistila katalýza montmorilonitom K10, pričom acetylácia prebiehala na N-acetylglukozamíne (Schéma 24).⁹⁴

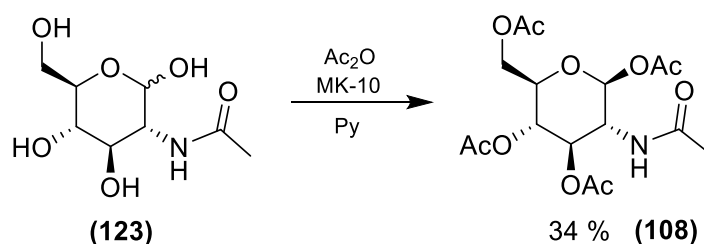
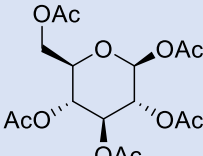
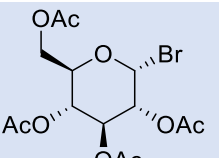


Schéma 24 Príprava 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-acetamido-β-D-glukopyranózy

Z uvedeného vyplýva, že pri pozorovaní vplyvu modifikovaných sacharidov niekedy reakcie nezahŕňajú len jedinú zamýšľanú zmenu, a preto výsledok prislúcha ich kombinácii. Interpretácia pôsobenia chrániacej skupiny na C² tak nie je úplne presná.

3.3.3. Vplyv odstupujúcej skupiny glykozyldonoru

Pohľad na vplyv odstupujúcej skupiny v skúmanej glykozylačnej reakcii už síce bol poskytnutý aj v rámci porovnania vplyvu rôznych esterov glykozidov (kap. 3.3.1.), no doplnený bol ešte o reakciu, kde bola ako glykozyldonor použitá α-acetobromoglukóza (**112**). Hoci s nižšou konverziou v porovnaní s referenčnou reakciou peracetylovanej glukózy, reakcia za katalýzy SnCl₄ prebiehala aj s derivátom **112**, a to prvotne za výlučnej tvorby N⁷ glukozidu (Tab. 8). Za zmienku na tomto mieste stojí publikácia, v ktorej sa špekuluje o mechanizme Vorbrüggenovej glykozylácie za katalýzy SnCl₄. Tá hovorí, že reakcia prebieha čiastočne aj mechanizmom zahŕňajúcim substitúciu 1'-O-acetylu za chlór zo SnCl₄ a až následnú tvorbu acyloxóniového kationu.⁹⁵

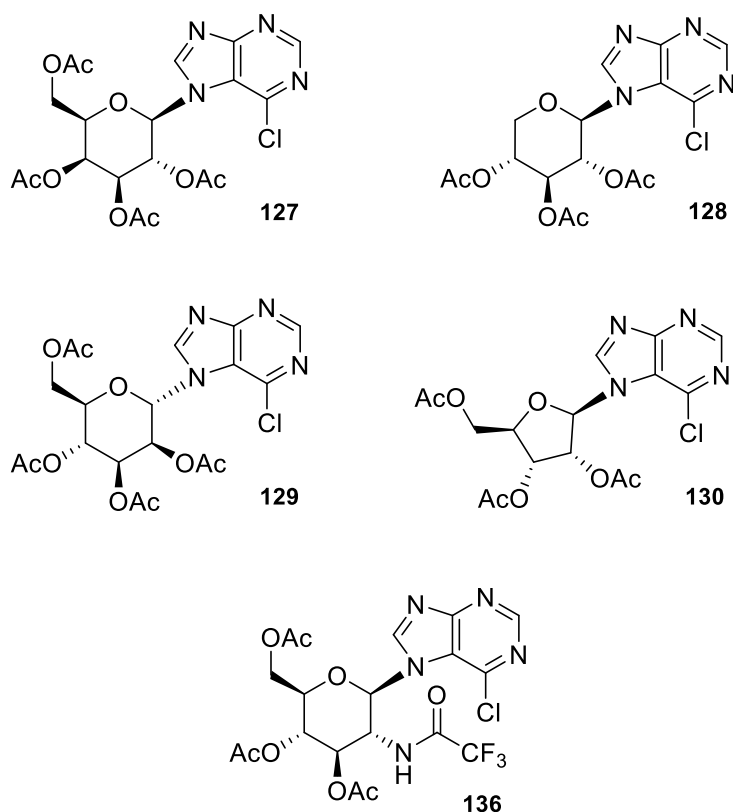
Der. sacharidu	Teplota	LA	čas	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	VP
 (99)	r.t.	SnCl ₄	1 d	4,4	99 %	7 %
		TiCl ₄	1 d	N ⁷ only	60–70 %	
 (112)		SnCl ₄	2 h	N ⁷ only	40 %	
			1 d	4,5	70 %	9 %
		TiCl ₄	2 h		-	
			1 d		-	

Tab. 8 Porovnanie výsledkov reakcií glykozylacetátu **99** a glykozylbromidu **112**

3.3.4. Glykozylačné reakcie ďalších glykozidov

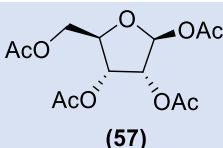
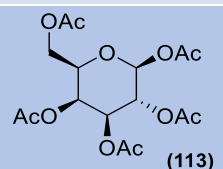
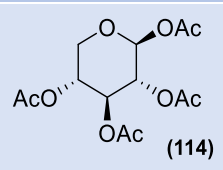
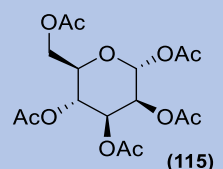
Ďalej bola pozornosť venovaná aplikácii vyvíjanej metódy pre iné glykozidy. Reakcie boli vedené za podmienok, ktoré sa v doterajšej štúdií uskutočňovanej na glukozidovom deriváte ukázali ako priaznivé. Nižšie popísané výsledky zhrňa Tab. 9.

Glykozylácia 6-chlórpurínu peracetylovanou β -D-ribofuranózou (**57**) v zhode s predchádzajúcimi výsledkami poskytla za katalýzy SnCl_4 dominujúci N^7 ribozid **130**, a vyššia selektivita bola dosiahnutá za katalýzy TiCl_4 . Peracetylovaná β -D-galaktopyranóza (**113**) poskytla výsledky analogické glukozidovému derivátu, tj. vznik vysoko dominujúceho N^7 galaktozidu **127** s takmer úplnou konverziou 6-chlórpurínu za katalýzy SnCl_4 , a N^7 regioselektívnu glykozyláciu za katalýzy TiCl_4 . V rovnakom trende reagovala peracetylovaná β -xylopyranóza (**114**), ktorá bola pripravená reakciou D-xylózy s acetanhydridom v prostredí octanu sodného⁹⁶, a poskytla xylozid **128**. Peracetylovaná α -D-manopyranóza (**115**) bola pripravená acetyláciou v pyridíne s katalytickým množstvom dimetylamínopyridínu⁹⁷ a N^7 regioselektívnu reakciu za vzniku manozidu **129** poskytla za zníženej teploty so zvýšeným podielom sacharidu na 1.5 ekvivalenta voči 6-chlórpurínu. Pre prípravu glukozamínového N^7 derivátu 6-chlórpurínu **136** bola nutná zmena glykozyl donoru (viď kap. 3.3.1.).



Obr. 20

Štruktúry pripravených N^7 glykozidov 6-chlórpurínu

Der. sacharidu	LA	Teplota	čas	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	VP
 (57)	SnCl ₄	r.t.	1 d	1,4	90 %	
	TiCl ₄	r.t.	1 d	6,6	75 %	
 (113)	SnCl ₄	r.t.	1 d	6,3	99 %	5 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d	N ⁷ only	60 %	2 %
 (114) * 1.5 eq.	SnCl ₄	r.t.	1 d	6,2	72 %	
	TiCl ₄	r.t.	1 d	N ⁷ only	65 %	
		6°C *	1 d	N ⁷ only	70 %	
 (115) * 1.5 eq.	SnCl ₄	r.t.	1 d	7	85 %	
		r.t. *	1 d	3	95 %	10 %
		6°C *	1 d	N ⁷ only	60 %	
	TiCl ₄				–	

Tab. 9 Výsledky reakcií glykozylácie 6-chlórpurínu

Pripravený bol aj peracetát laktózy,⁹⁸ avšak v glykozylačnej reakcii dochádza v značnom množstve k strate jedného acetylu. V reakcii so SnCl₄ vzniká len 5 % N⁹ peracetátu (125), čo je 6-násobne menej než N⁷ peracetátu (124), pričom mono-deacetylovaný produkt (126) zastúpený v reakčnej zmesi až zo 40 % pravdepodobne prislúcha taktiež N⁷ derivátu, čo však bolo určené len nejednoznačne z absorpčného spektra a ďalej nebolo overované.

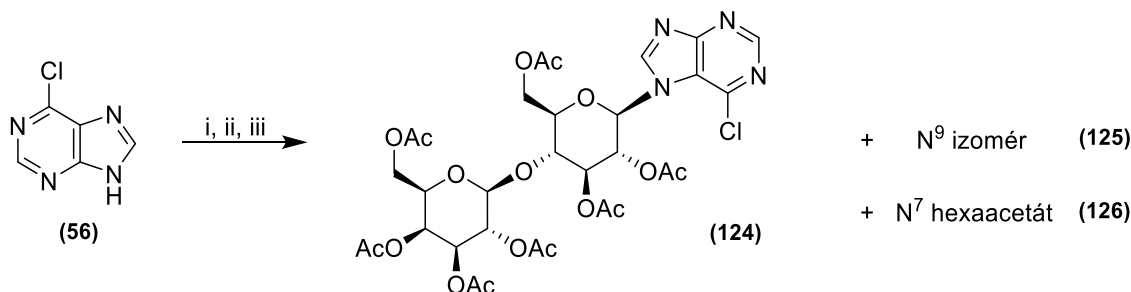


Schéma 17

- (i) 1.5 eq. BSA, 80°C, 30 min;
- (ii) 2.1 eq. SnCl₄, 0°C → r.t., 30 min
- (iii) 1.1 eq. peracetát laktózy, 24 h

3.4. Optimalizácia separácie zmesi izomérov

Izolácia N⁷ glykozidu z izomérskej zmesi je kritickým krokom výrazne ovplyvňujúcim výťažok glykozylácie a preto bola venovaná pozornosť aj tomuto procesu. Separácia bola vyladená na glukozide 6-chlórpurínu a následne aplikovaná na ostatné glykozidy s prípadnými malými obmenami v závislosti na zmene polarít produktov.

Izolácia prvotne spočívala v precíznej kolónovej chromatografii na aktivovanom silikagéli v gradiente metanolu v dichlórmétáne (0 – 1.5%), ktorá v stovkách miligramov umožnila úplné odseparovanie N⁷ a N⁹ izomérov glukozidu 6-chlórpurínu.

Pri snahách o kryštalizáciu spracovanej reakčnej zmesi dochádzalo k vzniku zmesných kryštálov a čistota N⁷ glykozidu sa tak nezlepšila. Nádej obísť chromatografické čistenie vyvstala z regioselektívnej reakcie katalyzovanej TiCl₄. V tomto prípade však nedochádzalo k tvorbe kryštálov a produkt z roztoku vypadal aj po mnohých obmenách kryštalizačných rozpúšťadiel vo forme oleja. Neschopnosť kryštalizácie bola pripísaná prítomnosti veľkého množstva nezreagovanej peracetylovanej glukózy.

Pre izoláciu N⁷ glykozidu zo surového produktu bola vyskúšaná ešte chromatografia na suchej kolóne za podtlaku (tzv. Dry Column Vacuum Chromatography; DCVC),⁹⁹ ktorá sa osvedčila s rovnako dobrým rozlíšením ako klasická kolónová chromatografia, no s výhodami menšej spotreby rozpúšťadiel a časovej náročnosti. Pre elúciu bol využitý gradient acetónu v toluéne (0 – 45%). Používaný silikagél však musí mať menšiu veľkosť častíc (pod 40 μm) a nutná je takisto precízna príprava utlačeného stĺpca silikagélu, čo tvorí kľúčové faktory dobrého rozlíšenia tejto techniky.

3.5. Optimalizácia deprotektie

Keďže N⁹ acetáty 6-chlórpurínových glykozidov sú bezproblémovo deacetylované v nasýtenom metanolicom či etanolicom roztoku amoniaku, deprotektia pripravených N⁷ analógov sa na prvý pohľad zdala uskutočniteľná obvyklou procedúrou. Amonolýza bola však sprevádzaná čiastočnou nukleofilnou substitúciou chlóru na C⁶ amoniakom za vzniku 6-aminopurín-7-glukozidu (**119**), ktorý kokryštalizoval s želaným 6-chlórpurín-7-glukozidom (**118**).

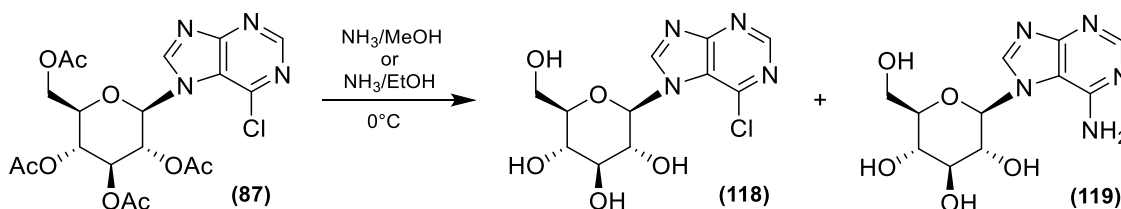


Schéma 25 Deacetylácia amonolýzou

Ďalšou možnosťou bola deacetylácia v bazickom prostredí v zmesi vody a alkoholu, pričom táto transesterifikačná reakcia bola popísaná aj pre N⁹ purínový nukleozid inozín triacetát za použitia trietylamínom katalyzovanej metanolýzy.¹⁰⁰ Výhodou tejto reakcie je eliminácia vzniku adenínu a zároveň možnosť odpariť všetky zložky reakčnej zmesi od produktu. Reaktivita 6-chlórpurínu **87** sa však prejavila opäť a to čiastočnou tvorbou ochráneného 6-metoxyderivátu **122**, ktorý bol identifikovaný až pomocou NMR, nakoľko má tento derivát rovnakú polaritu s želaným produktom. Ani zmena za etanol vedľajšej reakcii nezabránila a so stéricky bráneným isopropanolom už síce 6-isopropoxy derivát nevznikal, no k deacetylácii pravdepodobne dochádzalo za účasti vody a ako vedľajší produkt bol pomocou LC-MS zase pozorovaný derivát hypoxantínu.

Zaujímavé bolo zistenie, že pri snahe uskutočniť amonolýzu v tetrahydrofuráne nasýtenom amoniakom ani po dni reakcie k deacetylácii nedošlo. To nabádalo k úvahe, že aj pri klasickej deacetylácii v alkoholicom roztoku amoniaku je možno za ochránenie hydroxylových skupín zodpovedný alkohol, pričom amoniak, podobne ako v reakcii popísanej vyššie s trietylamínom, pôsobí ako bazický katalyzátor.

Z výsledkov bolo usúdené, že deacetyláciu nie je možné kvôli prítomnosti chlóru uskutočniť bez nutnosti chromatografického čistenia po deprotekcii, a preto je vhodnejšie ku ochráneniu hydroxylových skupín pristúpiť až po derivatizácii 6-chlórpurínu na C⁶.

3.6. Aplikácia vyvinutej metódy pre iné substráty

V doterajšej práci sa podarilo definovať podmienky za ktorých je 6-chlórpurín glykozylovaný predominantne do polohy N⁷. Aplikovateľnosť tejto metódy na iné substráty bola overená najmä pre 2,6-dichlórpurín, ktorý je ďalším dôležitým intermediátom pre rôzne purínové deriváty, vrátane guanínu či xantínu. Všeobecnú schému glykozylačnej reakcie skúšanej na 2,6-dichlórpuríne zobrazuje Schéma 26.

Vo všeobecnosti sa dá zhrnúť, že výsledky nenasledujú rovnaký trend ako u 6-chlórpurínu. Katalýza TiCl₄ neposkytuje v porovnaní s SnCl₄ regioselektívnejšiu reakciu a vo viacerých prípadoch zlyháva aj z hľadiska konverzie. Za katalýzy SnCl₄ u všetkých skúšaných glykozidov stále dominuje N⁷ produkt aj pri laboratórnej teplote. Pomer vznikajúcich N⁷/N⁹ glykozidov sa síce so zníženou teplotou väčšinou zlepšuje, ale v absolútnom množstve je kvôli vzniku iných vedľajších produktov vo výsledku N⁷ glykozidu menej. Výsledky so skúmanými sacharidmi sú uvedené v Tab. 10.

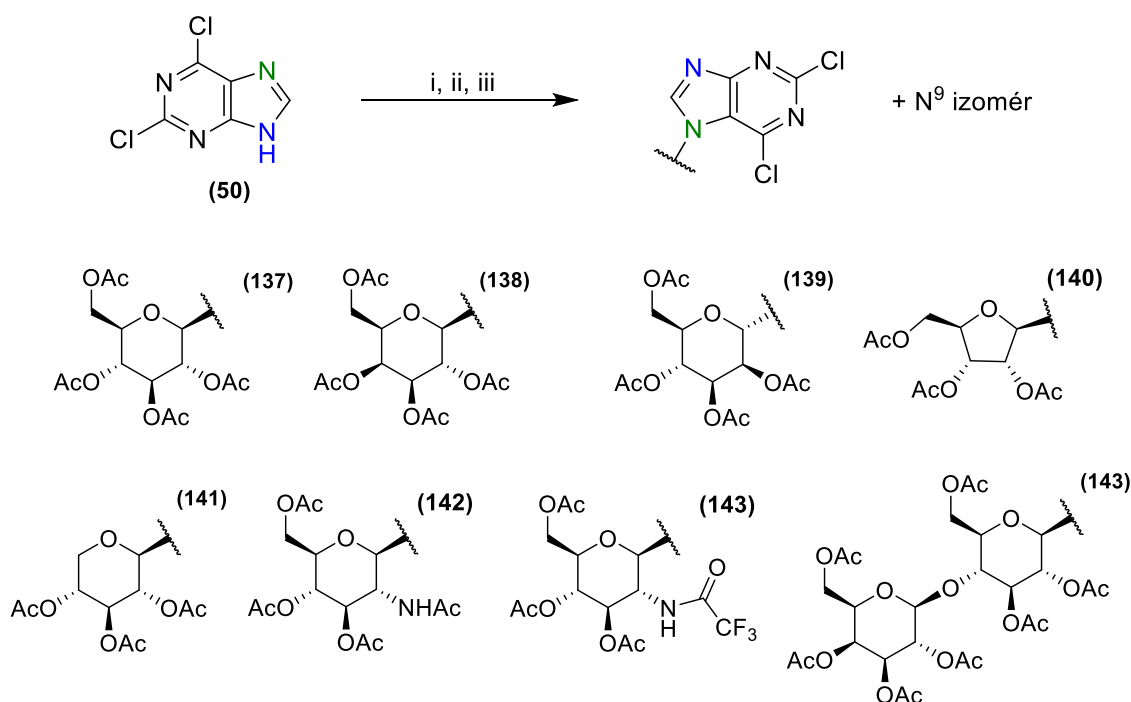
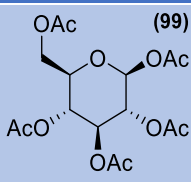
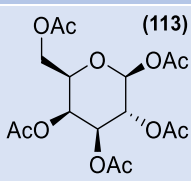
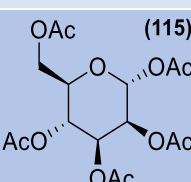
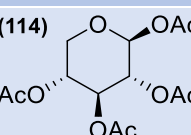
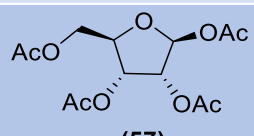
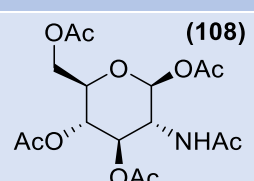
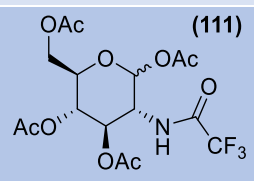
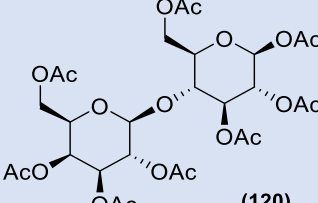


Schéma 26

- (i) 1.5 eq. BSA, 80°C, 30 min;
- (ii) 2.1 eq. SnCl₄ / TiCl₄, 0°C → 6°C / r.t., 30 min
- (iii) 1.1 eq. / 1.5 eq. glykozyldonor (57 / 99 / 108 / 111 / 113 / 114 / 115 / 120)
- (iv) 6°C / r.t., 1 deň

Der. sacharidu	LA	Teplota	čas	N ⁷ /N ⁹	Konverzia	VP
 (99) * 1.5 eq.	SnCl ₄	r.t.	1 d	1,5	80 %	4 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d	1,1	50 %	10 %
	SnCl ₄	6°C *	1 d	4	75 %	25 %
 (113) * 1.5 eq.	SnCl ₄	r.t.	1 d	2	99 %	10 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d	3,5	60 %	19 %
	SnCl ₄	6°C *	1 d	2,5	95 %	35 %
 (115)	SnCl ₄	r.t.	1 d	1,5	90 %	2 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d		–	
 (114)	SnCl ₄	r.t.	1 d	1,5	90 %	3 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d	1,2	80 %	5 %
 (57) * 1.5 eq.	SnCl ₄	r.t.	1 d	1,5	90 %	10 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d	0,5	99 %	8 %
	SnCl ₄	6°C *	1 d	1,5	95 %	20 %
 (108)	SnCl ₄	r.t.	1 d		–	
	TiCl ₄	r.t.	1 d		–	
 (111)	SnCl ₄	r.t.	1 d	2	15 %	5 %
	TiCl ₄	r.t.	1 d		–	
 (120)	SnCl ₄	r.t.	1 d	3	85 %	44 % (34 % monodeAc)
	TiCl ₄	r.t.	1 d	0,7	45 %	7 %

Tab. 10

Výsledky reakcií glykozylácie 2,6-dichlórpurínu

Pre zbežné zhodnotenie priebehu reakcii na iných purínových derivátoch boli vyskúšané nechránené deriváty adenín, guanín a hypoxantín. Vo všetkých prípadoch táto reakcia neprebíha ideálne, konverzia sa dosahuje až po zahriatí reakčných zmesí. Na LC-MS sú detekované viaceré izoméry glykozidov a v prípade hypoxantínu aj značné množstvo diglykozidov. Výsledky naznačujú, že pre aplikáciu metódy na tieto purínové deriváty je vhodné na nukleofilné substituenty zaviesť pred glykozyzáciou protektívne skupiny a glykozyzáciu ďalej optimalizovať.

Ďalšou myšlienkou bolo vykročiť z glykozidovej chémie a aplikovať metódu aj pre N⁷ alkylácie. Zatiaľčo za použitia etylbromidu ku alkylácii 6-chlórpurínu za týchto podmienok nedochádzalo a s benzylbromidom boli detekované len malé množstvá produktov, *tert*-butyl bromid poskytol regioselektívnu reakciu za vzniku jediného izoméru s vyše 50% konverziou, pričom čistý produkt bol získaný už po extrakcii reakčnej zmesi. Produkt **120** bol identifikovaný na základe líšiaceho sa spektra v porovnaní s príslušným N⁹ izomérom. Prekvapivé je, že príprava jeho N⁹ analógu nie je popísaná v literatúre priamym zavedením na purínový derivát, jedinou popísanou metódou prípravy 9-*tert*-butyl-6-chlórpurínu je cyklizáciou z 5-amino-4-(*tert*-butylamino)-6-chlórpyrimidínu.¹⁰¹

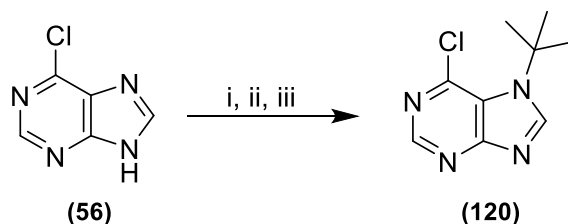
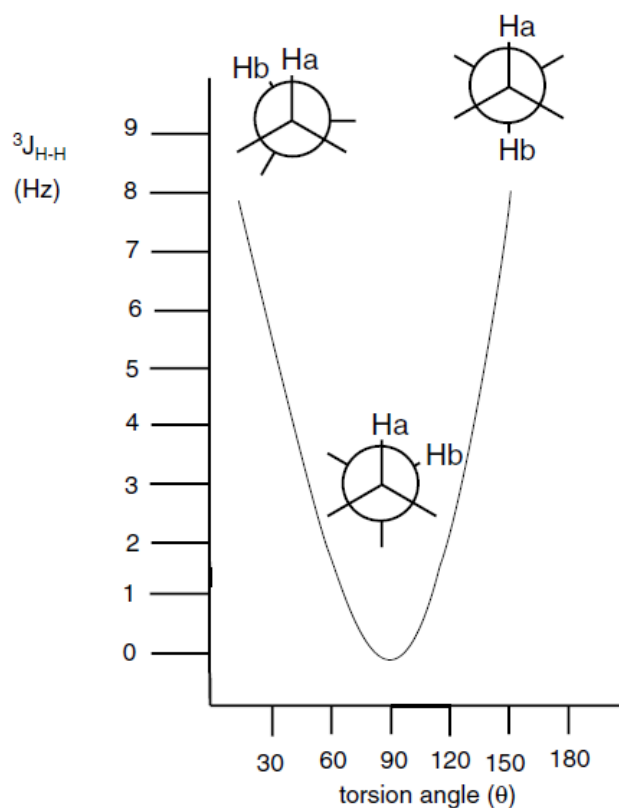


Schéma 27

(i)	1.5 eq. BSA, 80°C, 30 min;
(ii)	2.1 eq. SnCl ₄ , 0°C → r.t., 30 min
(iii)	1.5 eq. <i>tert</i> -butylbromid, r.t., 18 h

3.7. Identifikácia pripravených glykozidov

V rámci určenia identity pripravených glykozidov bolo nutné jednoznačné určenie miesta väzby sacharidu s purínovým derivátom, ako aj určenie konfigurácie tejto väzby. To, o aký anomér by sa malo jednať bolo predpokladané kvôli participujúcej skupine zabezpečujúcej vznik 1,2-*trans*-glykozidov, čo znamená β anoméry v prípade derivátov glukopyranózy, galaktopyranózy, xylopyranózy a ribofuranózy, zatiaľčo *trans*-glykozid manozidu zodpovedá anoméru α . Pokiaľ je známa konformácia glykozidu, anomérnu konfiguráciu je možné určiť z ^1H NMR spektra v závislosti od veľkosti interakčnej konštanty $J_{1,2}$. Tá sa odvíja z Karplusovho diagramu, ktorý popisuje koreláciu medzi $^3J_{\text{H-H}}$ štiepiacou konštantou a dihedrálным torzným uhlom (Obr. 21).



Obr. 21 Vzťah medzi interakčnou konštantou $^3J_{\text{H-H}}$ a torzným uhlom θ (prevzaté z ¹⁰²)

V prípade pyranóz D-cukrov je všeobecne preferovanou konformáciou $^4\text{C}_1$ konformácia, pričom interakčná konštantá $J_{1,2}$ je vysoká v prípade diaxiálnej interakcie (obvykle 8-10 Hz) a v prípade axiálno-ekvatoriálnej alebo diekvatoriálnej interakcie získavame hodnotu obvykle v rozmedzí 2-3 Hz.¹⁰² β -anoméru glukozidu **87** zodpovedá diaxiálna orientácia $\text{H}^{1'}$ a $\text{H}^{2'}$ a preto signál $\text{H}^{1'}$ nachádzame ako doublet s interakčnou konštantou $J_{1,2} = 8,5$ Hz (Schéma 28). Rovnaká je situácia pre analogický derivát β -galaktozidu **127** ($J_{1,2} = 6,8$ Hz) a β -xylozidu **128** ($J_{1,2} = 9,2$ Hz).

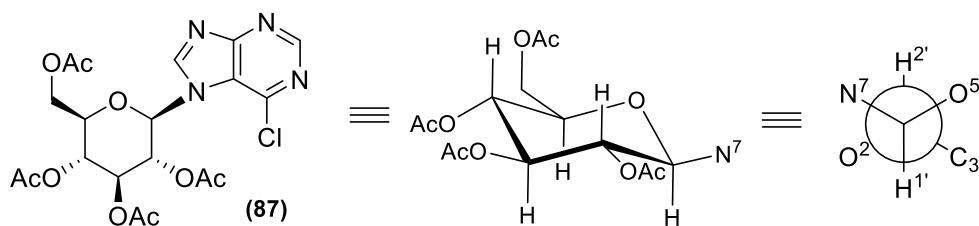


Schéma 28 Newmanova projekcia orientácie H^{1'} a H^{2'} vodíkov v ⁴C₁ konformácii glukozidu **87**

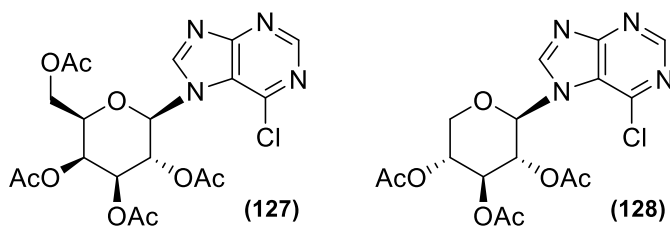
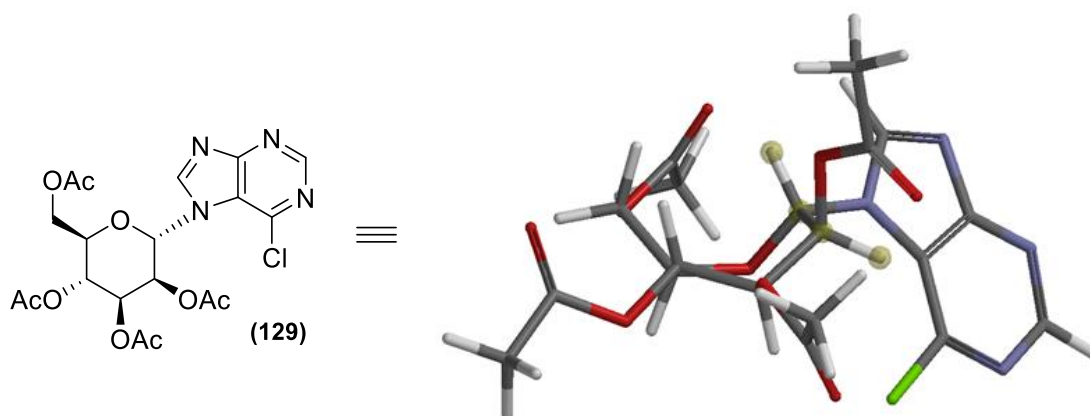


Schéma 29 β-anoméry galaktozidu **127** a xylozidu **128**

Iná situácia nastáva v prípade manozidov, ktoré majú v obvyklej ⁴C₁ konformácii orientovaný vodík H^{2'} ekvatoriálne. Z toho vyplýva v prípade oboch anomérov nízka interakčná konštanta, pričom sa zovšeobecňuje, že vyššia hodnota okolo 1,5 Hz prislúcha diekvatoriálnej interakcii, teda α-anoméru, zatiaľčo hodnota blízka 0,8 Hz patrí axiálno-ekvatoriálnej interakcii, tj. β-anoméru. Toto rozlíšenie však nie je dostatočne dôkazné a potrebné sú ďalšie experimenty, z ktorých je možné menovať napr. spoľahlivé stanovenie na základe ¹J_{C1',H1'} hodnoty¹⁰³, či uskutočnením NOE experimentov pozorujúc priestorovú interakciu väzobne vzdialených vodíkov v sacharide¹⁰⁴. Z mechanizmu nami uskutočnenej syntézy N⁷ manozidu 6-chlórpurínu **129** bol predpokladaný vznik α anoméru, avšak nameraná interakčná konštanta doubletu anomérneho vodíka mala hodnotu J_{1,2} = 8,2 Hz, čo poukázalo na fakt, že manozid **129** nezaujíma ⁴C₁ konformáciu. Zmeraný bol preto NOE experiment, kde bol selektívne ožiarený H^{1'}. Žiadna významná interakcia však nebola pozorovaná. Ďalej sme preto pristúpili k určeniu pravdepodobnej konformácie tejto látky, k čomu bol využitý *in-silico* výpočet konformérov o najnižšej energii (metóda DFT, software Spartan). Jedna z dvoch energeticky najvýhodnejších konformácií pre túto molekulu dáva odpoveď pre tak vysokú interakčnú konštantu, pretože dihedralný uhol medzi H^{1'} a H^{2'} je 137° (Obr. 22). Tento konformér má podľa výpočtov 5% zastúpenie a energeticky je o 5,5 kJ/mol vyšší než základný konformér, ktorý taktiež nie je v stoličkovej konformácii. Odpoveďou na vysokú interakčnú konštantu by bola aj ¹C₄ stoličková konformácia vzniknutá preklopením ⁴C₁, ktorá dostáva purínový skelet do ekvatoriálnej polohy a vodíky H^{1'} a H^{2'} do polohy diaxiálnej.



Obr. 22 Uvažovaný konformér tetraacetátu 6-chlórpurín-7- α -D-manopyranozidu (**129**)

U ribofuranozidu **130** bol β -anomér potvrdený taktiež na základe vyššej interakčnej konštanty $J_{1,2} = 4,6$ Hz. Podobné hodnoty nachádzame v literatúre pre β anoméry N⁹ purínových ribofuranozidov^{105,106}, pričom α -anoméry by mali túto konštantu nižšiu.

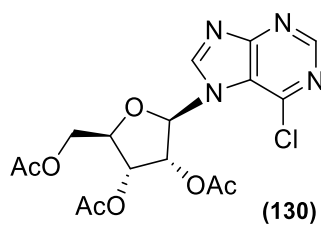
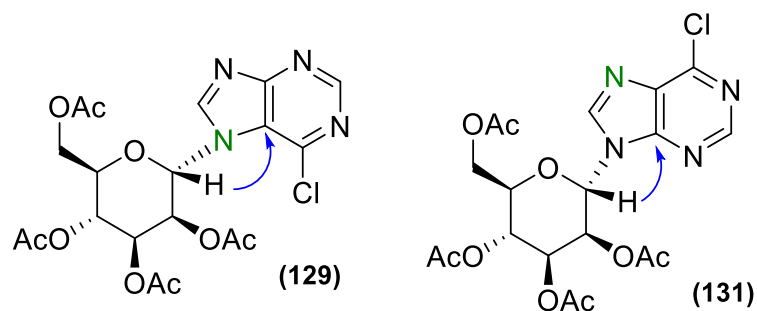


Schéma 30 β -anomér 6-chlórpurín-7- β -D-ribofuranozidu (**130**)

Určenie regioizoméru pripraveného glykozidu 6-chlórpurínu taktiež umožňujú NMR spektrá. Aj kvôli tomu bolo nutné priradenie signálov ¹H a ¹³C spektier k príslušným atómom v molekule (zobrazuje Tab. 11). V tabuľke je možné pozorovať, že chemické posuny jednotlivých atómov naprieč všetkými pripravenými N⁷ glykozidmi 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu korelujú a sú viacmenej zachované. Pre N⁷ glykozidy je charakteristický chemický posun uhlíka C⁵ pohybujúci sa pri 122 ppm. U zodpovedajúcich N⁹ izomérov je tento uhlík viac odstienený s posunom pri 132 ppm.¹⁰⁷ Jednoznačné určenie regioizoméru umožňuje HMBC experiment, kde v prípade N⁷ derivátov pozorujeme interakciu anomérneho vodíka s C⁸ a C⁵, zatiaľčo u N⁹ izomérov interaguje anomérny vodík s uhlíkmi C⁸ a C⁴ (Obr. 23). Túto interakciu z pripravených N⁷ glykozidov 6-chlórpurínu nevykazuje glukozid **87**, ktorého signál H^{1'} neposkytuje žiadnu interakciu. Pre túto zlúčeninu je však podpora v literatúre³², a takisto bola identita spektrálne overená na jeho ¹⁵N₄ značenom analógu. H^{1'}-C⁵ interakcia nie je prítomná ani v prípade galaktozidu **127** a aminoglukozidu 6-chlórpurínu **136**.

chránený 6-chlórpurín-N ⁷ -glykozid						
	α -manozid	β -xylozid	β -galaktozid	β -glukozid	β -amino glukozid	β -ribozid
	(129)	(128)	(127)	(87)	(136)	(130)
C2	152.9	153.0	153.0	153.1	152.9	152.9
C4	162.2	162.0	162.2	162.2	161.5	162.4
C5	122.3	122.1	122.2	122.2	122.5	122.0
C6	143.3	142.8	142.8	142.9	143.9	142.7
C8	147.0	146.5	146.7	146.3	147.2	145.7
H2	8.93	8.92	8.93	8.93	8.86	8.92
H8	8.58	8.50	8.55	8.49	8.80	8.71
H1'	6.64	6.12	6.15	6.18	6.67	6.67
H2'	5.74	5.57	5.80	5.69	5.03	5.62
H3'	5.51	5.47	5.31	5.47	5.72	5.43
H4'	5.10	5.20	5.58	5.28	5.33	4.52
H5'	4.24	4.34/3.65	4.31	4.08	4.22	4.46/4.40
H6'	4.88/4.12	-	4.21/4.13	4.28/4.19	4.3/4.3	-
C1'	77.6	83.2	83.1	82.6	82.6	87.7
C2'	67.6	70.4	67.7	69.8	53.3	74.5
C3'	68.2	72.3	71.1	72.9	71.9	69.4
C4'	67.4	68.2	66.9	67.6	67.5	80.3
C5'	76.0	65.5	74.1	75.1	74.9	62.3
C6'	59.8	-	61.2	61.4	61.5	-
HMBC H1'-C5	✓	✓	-	-	-	✓

Tab. 11 Vybrané chemické posuny chránených 6-chlórpurín-N⁷-glykozidov



Obr. 23 Rozlíšenie regioizomérov na základe interakcie H1'-C⁵ (129), resp. H1'-C⁴ (131)

3.8. Overenie možností C⁶ substitúcie N⁷ glukozidu 6-chlórpurínu

Po vyvinutí metódy pre prípravu N⁷ glykozidov 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu sa naskytla otázka kompatibility týchto produktov s podmienkami derivatizačných reakcií na purínovom skelete. Ako modelová zlúčenina bol vybraný 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**87**), na ktorom už bola v minulosti overená substitúcia chlóru amínmi za vzniku cytokynínových derivátov.⁶⁶ Pre tvorbu C-C väzby bol vybraný v medicínskej chémii obľúbený Suzuki-Miyaura coupling. Reakcia prebiehala v mikrovlnnom reaktore za katalýzy Pd(PPh₃)₄ v bazickom prostredí K₂CO₃ (Schéma 31). Skúšané reakcie prebiehali takmer s úplnou konverziou a po filtrácii a odparení bol produkt chromatograficky prečistený. V prípade couplingu s 4-metoxyfenyl-borónovou kyselinou bol získaný produkt **132** v 66% výťažku, zatiaľ čo couplingová reakcia s 3-tienylborónovou kyselinou poskytla **133** vo výťažku 55 %.

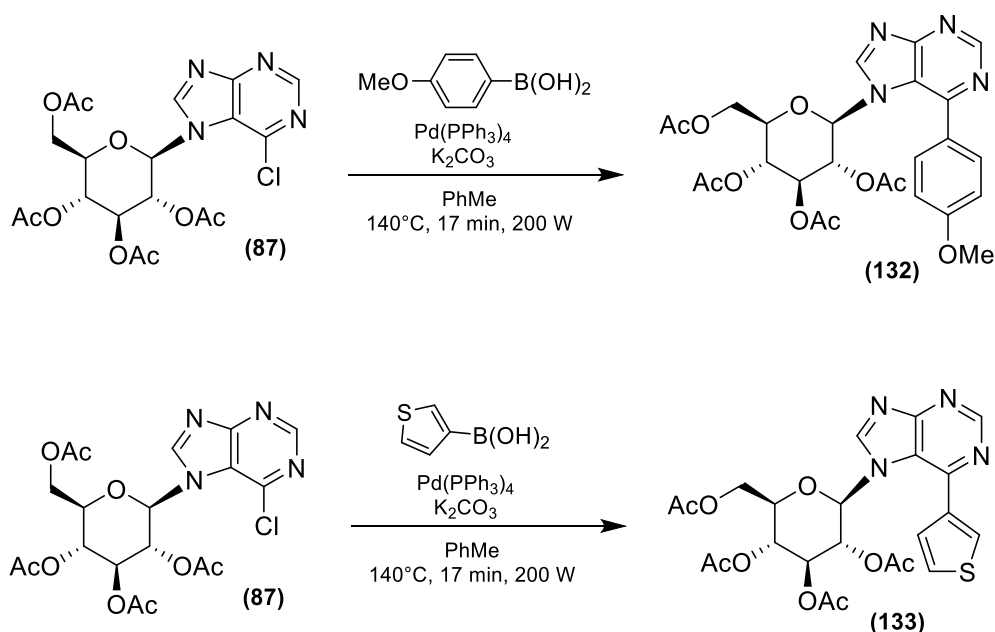


Schéma 31 C⁶ derivatizácia pomocou Suzuki-Miyaura couplingu

Ďalšia derivatizácia zahŕňala známu substitúciu chlóru tioacetátom draselným za tvorby 6-merkaptoderivátu **134**.³⁶ Po ukončení reakcie bol produkt separovaný na kolóne s výťažkom 63 %.

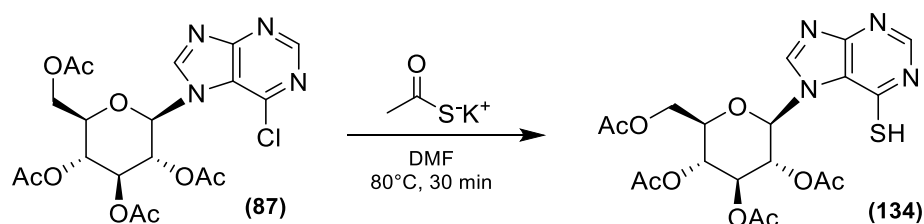


Schéma 32 Príprava tetraacetátu 6-merkaptopurín-7-β-D-glukozidu (**134**)

Ďalšou overovanou reakciou bola premena na hypoxantínový derivát **135** vyžadujúca kyslé podmienky, na ktoré je vo všeobecnosti glykozidová väzba náchylná. Pre jeho prípravu boli použité podmienky popísané na 7-alkylovanom 6-chlórpuríne⁷⁶, tj. 7-glukozid **87** zahrievaný v kyseline mravčej (Schéma 33). V reakcii bol ako vedľajší produkt pozorovaný hypoxantín vznikajúci štiepením glykozidovej väzby, a ktorý bol v reakčnej zmesi prítomný asi z 30 %. Po odparení reakčnej zmesi nasledoval reflux v etanole a po chromatografickom prečistení bol získaný želaný produkt **135** v 31% výťažku. Na mieste bolo takisto opätovné overenie regioizoméru, nakoľko v kyslých podmienkach môže dochádzať k transglykozylačným reakciám (priebeh transglykozylácie N⁷ izoméru **87** za vzniku zmesi s N⁹ izomérom **88** bol potvrdený v kap. 3.1.). Ako bolo však už spomenuté, práve glukozid 6-chlórpurínu **87** ako jediný z tejto série glykozidov neposkytuje preukázateľnú interakciu H^{1'} s C⁵ v HMBC spektre. Potvrdenie, že sa stále jedná o N⁷ derivát umožnilo porovnanie so staršou literatúrou¹⁰⁸, ktorá uvádza chemický posun anomérnych vodíkov N⁷ aj N⁹ regioizoméru.

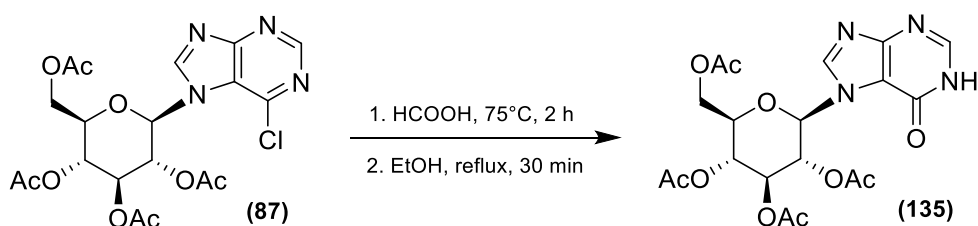


Schéma 33

Príprava tetraacetátu hypoxantín-7-β-D-glukozidu (**135**)

Úspešne uskutočnené derivatizačné reakcie naznačujú, že N⁷ glykozidy 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu budú schopné podliehať rôznym podmienkam, čím sa tieto glykozidy stávajú významným zdrojom pre purínových N⁷ glykozidov. Priaznivosť existencie tohto prístupu podporuje aj nemožnosť prípravy glykozidov hypoxantínu, adenínu a guanínu bez vzniku izomérnych zmesí.

4. Experimentálna časť

Všetky pripravované látky boli syntetizované z komerčne dostupných zlúčenín bez čistenia v kvalite deklarovanej výrobcom. 6-Chlórpurín bol pred reakciou sušený pri 120°C po dobu 1 h. Silikagél pre kolónovú chromatografiu bol pre jeho aktiváciu sušený pri 140°C po dobu 24 hod. Pri reakciách vyžadujúcich neprítomnosť vody boli použité komerčne dostupné bezvodé rozpúšťadlá s deklarovaným maximálnym obsahom vody s prípadným dosušením pomocou molekulových síť. Priebeh chemických reakcií a čistota pripravených zlúčenín bola sledovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie na hliníkových platničkách DC-Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck), detekcia bola uskutočnená pomocou UV žiarenia ($\lambda = 254$ nm) a UV inaktívne látky boli vizualizované etanolickým roztokom kyseliny fosfomolybdénovej. LC-MS analýzy boli merané na UHPLC-MS systéme, zloženého z UHPLC chromatografu Accela s PDA detektorom a hmotnostného spektrometra TSQ Quantum Access s APCI iónovým zdrojom a trojitým kvadrupólovým hmotnostným analyzátorom (Thermo Scientific, CA, USA). High resolution MS analýzy boli merané na LC-MS systéme, zloženého z UHPLC chromatografu Dionex Ultimate 3000 s PDA detektrom a hmotnostného spektrometra Thermo Exactive Plus s ESI iónovým zdrojom a orbitrap hmotnostným analyzátorom (Thermo Scientific, MA, USA). ^1H a ^{13}C NMR spektrá boli merané v DMSO- d_6 , resp. CDCl_3 - d pri 25°C na NMR spektrometri JEOL ECA 400II pri frekvencii 400 MHz (^1H) a 100 MHz (^{13}C). Chemické posuny (δ) sú uvedené v jednotkách ppm s kalibráciou na signál reziduálneho rozpúšťadla.

6-Chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (87)

K 6-chlórpurínu (39 mg; 0,25 mmol) bol pridaný suchý 1,2-dichlóretán (2,5 ml) a po vytvorení inej atmosféry bol pridaný *N,O*-bis(trimetylsilyl)acetamid (92 µl, 0,38 mmol). Reakčná zmes bola zahrievaná 30 min pri 74°C. Po ochladení reakčnej zmesi v ľadovom kúpeli bol pridaný TiCl₄ (58 µl; 0,53 mmol) a reakcia bola miešaná 30 minút za postupného samovoľného ohriatia reakčnej zmesi na laboratórnu teplotu. Po prídavku roztoku pentaacetátu β-D-glukopyranózy (107 mg; 0,28 mmol) v 1,2-dichlóretáne (1,4 ml) bola reakcia za laboratórnej teploty miešaná 22 hodín (alternatívne 2 h pri 40°C). Po uplynutí reakčného času bola reakcia ukončená prídavkom iPrOH (1,3 ml), nariedená chloroformom (13 ml) a extrahovaná soľankou, nasýteným roztokom NaHCO₃ a znovu soľankou (po 13 ml). Organická vrstva bola vysušená Na₂SO₄, prefiltrovaná a po odparení chromatograficky prečistená (DCVC, 30 g SiO₂, priemer kolóny 3,5 cm, zmes acetónu v toluéne 0-45 %) za zisku bielej látky (73 mg, 60 %).

Alternatívny postup: Za použitia SnCl₄ (namiesto TiCl₄) vo vyššie uvedenej reakcii bol po separácii kolónovou chromatografiou získaný produkt **87** v 70% výťažku spolu s jeho N⁹ izomérom **88** v 20% výťažku.

6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (87)

C₁₉H₂₁ClN₄O₉ (M = 484,8 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 485,1070; namerané 485,1072

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.93 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 6.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.69 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 5.47 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.28 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 12.6, 5.0 Hz, 1H), 4.19 (dd, J = 12.6, 1.8 Hz, 1H), 4.06-4.10 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.88 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.4, 169.9, 169.2, 169.0, 162.2, 153.1, 146.3, 142.9, 122.2, 82.6, 75.1, 72.9, 69.8, 67.6, 61.4, 20.6, 20.5, 20.4, 20.2 (identické s literatúrou ¹⁰⁷)

6-(4-Metoxyfenyl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (132)

6-Chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**87**, 121 mg; 0,25 mmol) bol rozpustený v toluéne (5 ml) a následne bol pridaný Pd(PPh₃)₄ (14 mg; 5 mol%), 4-metoxyfenyl-borónová kyselina (57 mg; 0,38 mmol) a K₂CO₃ (52 mg; 0,38 mmol). Reakcia prebiehala v mikrovlnnom reaktore (70 W, 140°C, 17 min), následne bola reakčná zmes prefiltrovaná, odparená a po separácii na kolóne (DCVC, zmes acetónu v toluéne 0-50 %) bola získaná biela látka (93 mg, 66 %).

6-(4-metoxyfenyl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (132)

C₂₆H₂₈N₄O₁₀ (M = 556,5 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 557,1878; namerané 557,1881

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.18 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.63 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.08-5.16 (m, 2H), 4.23 (dd, J = 12.5, 5.5 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 12.5, 2.5 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.50-3.54 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.80 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.3, 167.0, 169.1, 168.8, 161.6, 153.5, 151.6, 146.1, 130.3, 128.6, 128.4, 122.6, 114.5, 81.2, 74.5, 73.0, 69.0, 67.6, 61.8, 55.6, 20.7, 20.5, 20.4, 20.2

6-(Tiofén-3-yl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (133)

6-Chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**87**, 121 mg; 0,25 mmol) bol rozpustený v toluéne (5 ml) a následne bol pridaný Pd(PPh₃)₄ (14 mg; 5 mol%), 3-tienylborónová kyselina (48 mg; 0,38 mmol) a K₂CO₃ (52 mg; 0,38 mmol). Reakcia prebiehala v mikrovlnnom reaktore (70 W, 140°C, 17 min), následne bola reakčná zmes prefiltrovaná, odparená a po separácii na kolóne (DCVC, zmes acetónu v toluéne 0-45 %) bola získaná biela látka (73 mg, 55 %).

6-(tiofén-3-yl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (133)

C₂₃H₂₄N₄O₉S (M = 532,5 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 533,1337; namerané 533,1340

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.17 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.90 (dd, J = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 5.0, 2.7 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 5.0, 1.4 Hz, 1H), 5.65 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 5.52 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 5.11-5.17 (m, 2H), 4.19 (dd, J = 12.8, 6.0 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 12.8, 2.0 Hz, 1H), 3.52-3.56 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.81 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.2, 169.9, 169.2, 168.8, 161.6, 153.6, 147.4, 146.1, 136.8, 127.9, 127.6, 127.1, 122.8, 81.2, 74.7, 73.0, 68.9, 67.5, 61.8, 20.7, 20.5, 20.4, 20.2

6-Merkaptopurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (134)

K naváženému 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**87**, 121 mg; 0,25 mmol) a tiooctanu draselnému (39 mg; 0,34 mmol) bol pridaný *N,N*-dimetylformamid (1 ml) a vzniknutá suspenzia bola nechaná reagovať 30 minút pri 80°C. Po odparení reakčnej zmesi bol produkt chromatograficky prečistený (DCVC, zmes acetónu v petrolétere 0-100 %) a získaný bol hnedý prášok (76 mg, 63 %).

6-merkaptopurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (134)

C₁₉H₂₂N₄O₉S (M = 482,5 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 483,1180; namerané 483,1182

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 11.78 (br s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.64 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.49 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.26-5.30 (m, 1H), 4.14-4.31 (m, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.05 (s, 3H), 1.92 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.8, 170.0, 169.5, 152.8, 145.1, 144.1, 125.5, 81.2, 74.4, 73.3, 69.6, 67.8, 61.4, 20.8, 20.6, 20.4

(signál jedného uhlíku purínu chýba; uhlíky jedného acetylu sa prekrývajú so signálom iného)

Hypoxantín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (135)

6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**87**, 61 mg; 0,13 mmol) bol po dobu 60 minút zahrievaný pri 75°C v kyseline mravčej (1,25 ml). Reakčná zmes bola odparená a po prídavku etanolu (1,25 ml) refluxovaná 30 minút. Po opätovnom odparení bol produkt separovaný na kolóne (DCVC, zmes metanolu v chloroforme 0-20 %) a získaná bola biela látka (18 mg, 31 %).

Hypoxantín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (135)

C₁₉H₂₂N₄O₁₀ (M = 466,4 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 467,1409; namerané 467,1411

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 11.88 (br s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.20 (br s, 1H), 5.78 (br t, 1H), 5.53 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 5.35 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 12.7, 4.7 Hz, 1H), 4.19 (dd, J = 12.7, 2.3 Hz, 1H), 4.09-4.13 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.86 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.5, 170.1, 169.4, 169.0, 157.7, 154.9, 145.0, 142.2, 115.1, 83.0, 74.8, 72.9, 70.5, 67.8, 61.7, 20.7, 20.5 (2x), 20.2

6-Chlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (127)

6-Chlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (127) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (87) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) a za použitia pentaacetátu β-D-galaktopyranózy (430 mg; 1,1 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne separovaná kolónovou chromatografiou (50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes metanolu v dichlórmetáne 0-1,5 %). Získaná bola biela látka vo výťažku 56 % (271 mg).

6-chlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (127)

C₁₉H₂₁ClN₄O₉ (M = 484,8 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 485,1070; namerané 485,1069

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.93 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 6.15 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.80 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.58 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.31 (dd, J = 9.4, 3.0 Hz, 1H), 4.29-4.32 (m, 1H), 4.21 (dd, J = 11.5, 5.5 Hz, 1H), 4.13 (dd, J = 11.7, 7.1 Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.86 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.3, 169.9, 169.7, 169.1, 162.2, 153.0, 146.7, 142.8, 122.2, 83.1, 74.1, 71.1, 67.7, 66.9, 61.2, 20.6 (2x), 20.4, 20.2

6-Chlórpurín-7-α-D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (129)

6-Chlórpurín-7-β-D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (129) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (87) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) s týmito obmenami: SnCl₄ (namiesto TiCl₄), 6°C (namiesto laboratórnej teploty) a 1.5 ekvivalenta pentaacetátu α-manopyranózy (namiesto 1.1 eq.; 585 mg; 1,5 mmol). Po 22 hodinách reakcie pri 6°C bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne chromatograficky separovaná (DCVC, 50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes acetónu v toluéne 0-40 %). Získaná bola biela látka vo výťažku 50 % (242 mg).

6-chlórpurín-7-α-D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (129)

C₁₉H₂₁ClN₄O₉ (M = 484,8 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 485,1070; namerané 485,1070

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.93 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 6.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz, 1H), 5.52 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H), 5.10 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 1H), 4.89 (dd, $J = 12.1, 8.9$ Hz, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.13 (dd, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.88 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.6, 169.3, 168.9 (2x), 162.2, 152.9, 147.0, 143.3, 122.3, 77.6, 76.0, 68.2, 67.6, 67.4, 59.8, 20.8, 20.7, 20.6, 20.3

6-Chlórpurín-7- β -D-2'-trifluoracetamido-2'-deoxyglukopyranozid-3',4',6'-triacetát (136)

6-Chlórpurín-7- β -D-2'-trifluoracetamido-2'-deoxyglukopyranozid-3',4',6'-triacetát (**136**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**87**) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) za použitia 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoracetamido- β -D-glukopyranózy (488 mg; 1,1 mmol) a s obmenou SnCl_4 (namiesto TiCl_4). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne chromatograficky separovaná (DCVC, 50 g SiO_2 , priemer kolóny 4 cm, zmes acetónu v toluéne 0-50 %). Získaná bola biela látka vo výťažku 35 % (188 mg).

6-chlórpurín-7- β -D-2'-trifluoracetamido-2'-deoxyglukopyranozid-3',4',6'-triacetát (136)

$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_8$ ($M = 537,1$ g/mol)

HRMS (ESI, m/z), vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ 538,0947; namerané 538,0950

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 9.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 6.67 (br s, 1H), 5.72 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.33 (t, $J = 8.7$, 1H), 5.03 (br s, 1H), 4.20-4.31 (m, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.6, 170.5, 169.2, 161.5, 158.1 (q, $J = 39.6$ Hz), 152.9, 147.2 (br s), 143.9 (br s), 122.5, 115.2 (q, $J = 287.5$ Hz), 82.6 (br s), 74.9, 71.9, 67.5, 61.5, 53.3, 20.7, 20.5, 20.2

6-Chlórpurín-7-β-D-xylopyranozid-2',3',4'-triacetát (128)

6-Chlórpurín-7-β-D-xylopyranozid-2',3',4'-triacetát (**128**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**87**) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) s týmito obmenami: 6°C (namiesto laboratórnej teploty) a 1.5 ekvivalenta tetraacetátu β-xylopyranózy (namiesto 1.1 eq.; 477 mg; 1,5 mmol). Po 22 hodinách reakcie pri 6°C bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne chromatograficky separovaná (DCVC, 50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes acetónu v toluéne 0-40 %) za zisku bielej látky vo výťažku 50 % (206 mg).

6-chlórpurín-7-β-D-xylopyranozid-2',3',4'-triacetát (128)

C₁₆H₁₇ClN₄O₇ (M = 412,8 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 413,0859; namerané 413,0858

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.92 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 6.12 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.57 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 5.47 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.17 – 5.24 (m, 1H), 4.34 (dd, J = 11.7, 5.7 Hz, 1H), 3.65 (t, J = 11.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.84 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 169.9, 169.6, 169.0, 162.1, 153.0, 146.5, 142.8, 122.1, 83.2, 72.3, 70.4, 68.2, 65.5, 20.6, 20.5, 20.1

6-Chlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (130)

6-Chlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (**130**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**87**) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) a za použitia tetraacetátu β-D-ribofuranózy (350 mg; 1,1 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne separovaná kolónovou chromatografiou (50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes metanolu v dichlórmetáne 0-1,5 %). Získaná bola biela látka vo výťažku 36 % (149 mg).

6-chlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (130)

C₁₆H₁₇ClN₄O₇ (M = 412,8 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 413,0859; namerané 413,0858

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.92 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 6.67 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.62 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.43 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.52 (ddd, J = 5.3, 3.0, 2.8 Hz 1H), 4.46 (dd, J = 12.6, 3.0 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 12.6, 2.5 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.1, 169.4, 169.0, 162.4, 152.9, 145.7, 142.7, 122.0, 87.7, 80.3, 74.5, 69.4, 62.3, 20.8, 20.4, 20.3

2,6-Dichlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (137)

K 2,6-dichlórpurínu (189 mg; 1 mmol) bol pridaný suchý 1,2-dichlóretán (10 ml) a po vytvorení inertnej atmosféry bol pridaný *N,O*-bis(trimetylsilyl)acetamid (368 μl, 1,5 mmol). Reakčná zmes bola zahrievaná 30 min pri 74°C. Po ochladení reakčnej zmesi v ľadovom kúpeli bol pridaný SnCl₄ (245 μl; 2,1 mmol) a reakcia bola miešaná 30 minút za postupného samovoľného ohriatia reakčnej zmesi na laboratórnu teplotu. Po prídavku roztoku pentaacetátu β-D-glukopyranózy (430 mg; 1,1 mmol) v 1,2-dichlóretáne (5,5 ml) bola reakcia za laboratórnej teploty miešaná 22 hodín. Po uplynutí reakčného času bola reakcia ukončená prídavkom iPrOH (5 ml), nariedená chloroformom (50 ml) a extrahovaná soľankou, nasýteným roztokom NaHCO₃ a znovu soľankou (po 50 ml). Organická vrstva bola vysušená Na₂SO₄, prefiltrovaná a po odparení chromatograficky prečistená (DCVC, 50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes etylacetátu v petrolétere 0-65 %) za zisku bielej látky (219 mg, 42 %).

2,6-dichlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (137)

C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₉ (M = 519,3 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 519,0680; namerané 519,0682

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.48 (s, 1H), 6.10 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.67 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.46 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 12.6, 5.0 Hz, 1H), 4.19 (dd, J = 12.6, 2.1 Hz, 1H), 4.06 (ddd, J = 10.1, 5.1, 2.2 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.91 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.4, 169.9, 169.2, 169.0, 163.9, 154.0, 147.7, 143.6, 121.4, 82.7, 75.1, 72.8, 69.7, 67.4, 61.3, 20.6, 20.5, 20.5, 20.2

2,6-Dichlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (138)

2,6-Dichlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**138**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 2,6-dichlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**137**) za použitia pentaacetátu β-D-galaktopyranózy (430 mg; 1,1 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná a následne chromatograficky separovaná (DCVC, 50 g SiO₂, priemer kolóny 4 cm, zmes etylacetátu v toluéne 0-55 %) za zisku bielej látky vo výťažku 50 % (260 mg).

2,6-dichlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (138)

C₁₉H₂₀Cl₂N₄O₉ (M = 519,3 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 519,0680; namerané 519,0679

^1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.56 (s, 1H), 6.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.78 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 5.57 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.29 (dd, J = 10.1, 3.4 Hz, 1H), 4.31 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 11.7, 5.5 Hz, 1H), 4.12 (dd, J = 11.7, 7.1 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.89 (s, 3H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.3, 169.8, 169.6, 169.1, 163.8, 153.8, 148.2, 143.6, 121.4, 83.2, 74.2, 70.9, 67.7, 66.9, 61.2, 20.6 (2x), 20.4, 20.2

2,6-Dichlórpurín-7- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (139)

2,6-Dichlórpurín-7- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (**138**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 2,6-dichlórpurín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**137**) za použitia pentaacetátu α -D-manopyranózy (430 mg; 1,1 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná. Časť surového produktu bola (z časových dôvodov) separovaná pomocou semipreparatívneho HPLC. Výťažok preto nebol stanovený (hypoteticky na základe LC-MS 50%).

2,6-dichlórpurín-7- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (139)

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_9$ (M = 519,3 g/mol)

HRMS (ESI, m/z), vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ 519,0680; namerané 519,0682

^1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.57 (s, 1H), 6.58 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.73 (dd, J = 8.2, 3.2 Hz, 1H), 5.50 (t, J = 3.9 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 4.5, 2.6 Hz, 1H), 4.92 (dd, J = 12.3, 9.3 Hz, 1H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.08 (dd, J = 12.4, 3.9 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.90 (s, 3H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.7, 169.2, 168.9, 168.9, 163.9, 153.8, 148.4, 144.1, 121.5, 77.9, 76.2, 68.1, 67.6, 67.4, 59.7, 20.8, 20.7, 20.6, 20.3

2,6-dichlórpurín-9- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (139)

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_9$ (M = 519,3 g/mol)

HRMS (ESI, m/z), vypočítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ 519,0680; namerané 519,0682

^1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.29 (s, 1H), 6.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.08 (dd, J = 8.1, 3.3 Hz, 1H), 5.58 (t, J = 3.9 Hz, 1H), 5.08 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.82 (dd, J = 12.4, 8.7 Hz, 1H), 4.30-4.34 (m, 1H), 4.14 (dd, J = 12.4, 3.9 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.92 (s, 3H)

^{13}C -NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.7, 169.4, 169.0, 168.9, 153.5, 152.9, 152.3, 144.7, 131.1, 77.7, 75.3, 68.0, 67.7, 66.3, 60.2, 20.8, 20.8, 20.7, 20.4

2,6-Dichlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (140)

2,6-Dichlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (**140**) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 2,6-dichlórpurín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (**137**) za použitia tetracetátu β-D-ribofuranózy (350 mg; 1,1 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná. Časť surového produktu bola (po neúspechu kolónovej chromatografie) separovaná pomocou semipreparatívneho HPLC. Výtazok preto nebol stanovený (hypoteticky na základe LC-MS 40%).

2,6-dichlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (140)

C₁₆H₁₆Cl₂N₄O₇ (M = 447,2 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.71 (s, 1H), 6.60 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.59 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.41 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.50-4.53 (m, 1H), 4.46 (dd, J = 12.6, 3.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 12.6, 2.5 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.0, 169.4, 169.0, 164.0, 153.7, 147.2, 143.4, 121.2, 87.8, 80.5, 74.4, 69.5, 62.3, 20.8, 20.4, 20.2

2,6-dichlórpurín-9-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (140)

C₁₆H₁₆Cl₂N₄O₇ (M = 447,2 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.29 (s, 1H), 6.21 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.79 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 5.57 (dd, J = 5.5, 4.4 Hz, 1H), 4.40-4.49 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 170.1, 169.5, 169.3, 153.5, 152.6, 152.4, 143.7, 131.4, 86.5, 80.9, 73.2, 70.6, 62.9, 20.7, 20.5, 20.3

(identické s literatúrou ¹⁰⁹)

7-*Tert*-butyl-6-chlórpurín (120)

7-*Tert*-butyl-6-chlórpurín (120) bol pripravený analogicky s postupom prípravy 6-chlórpurín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetátu (87) vychádzajúc z vyššej návažky 6-chlórpurínu (154 mg; 1 mmol) s týmito obmenami: SnCl₄ (namiesto TiCl₄) a 1.5 ekvivalenta *tert*-butylbromidu (namiesto 1.1 eq. pentaacetátu β -D-glukopyranózy; 169 μ l, 1,5 mmol). Po 22 hodinách reakcie za laboratórnej teploty bola reakčná zmes analogicky spracovaná, pričom už odparením po extrakcii bola získaná sčasti kryštalická biela látka (105 mg, 50 %).

7-*tert*-butyl-6-chlórpurín (120)

C₉H₁₁ClN₄ (M = 210,7 g/mol)

HRMS (ESI, *m/z*), vypočítané pre [M+H]⁺ 211,0745; namerané 211,0747

¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 8.88 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 1.92 (s, 9H)

¹³C-NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ 163.7, 151.9, 146.9, 142.8, 123.2, 59.2, 31.2

5. Záver

Chémia nukleozidových mimetík je dlhodobo aktuálnou témou poskytujúcou výsledky v podobe mnohých biologicky aktívnych látok najmä s antivirotickým či cytostatickým účinkom. Jedna z doposiaľ zanedbávaných oblastí tejto témy sú N⁷ substituované purínové deriváty, pre ktoré nie je popísaná dostatočne vhodná metóda prípravy. V rámci diplomovej práce sa postupnou štúdiou závislostí distribúcie N⁷ a N⁹ regioizomérov na reakčných podmienkach a štruktúre glykozyl donoru podarilo dospieť k širšie aplikovateľnej metóde prípravy purínových N⁷ glykozidov. Zavedenie trimetylsilylovej skupiny na 6-chlórpurín, resp. 2,6-dichlórpurín, a následná glykozylácia vhodne chráneným derivátom sacharidu za katalýzy SnCl₄ či TiCl₄ poskytuje N⁷ izomér ako predominantný regioizomér, v niektorých prípadoch aj ako výlučný produkt. Z pripravených N⁷ derivátov purínu bol v minulosti popísanou látkou peracetát 7-β-D-glukopyranozid a 7-β-D-xylopyranozid 6-chlórpurínu. Očakávané je ešte biologické testovanie pripravených N⁷ derivátov, ktorého výsledky však do ukončenia záverečnej práce nestihli byť získané.

Vyvinutá metóda dáva vznik N⁷ glykozidom 6-chlórpurínu a 2,6-dichlórpurínu vo výťažkoch 35 – 60 %. Zbežne bola overená aj kompatibilita týchto glykozidov pri ďalších derivatizáciách spočívajúcich v substitúcii chlóru za tvorby C-N, C-C, C-S- či C-O väzby. Zaujímavým zistením je aj aplikovateľnosť metódy pre alkyláciu 6-chlórpurínu pomocou *tert*-butylbromidu s výťažkom 50 %.

Odvážnym práním autora v závere práce je, aby bola táto metóda využitá k preskúmaniu biologického potenciálu N⁷ substituovaných purínových nukleozidových mimetík.

6. Použitá literatura

- (1) Lister, J. H. *Chemistry of Heterocyclic Compounds: Fused Pyrimidines, Part II: Purines*; Chemistry of Heterocyclic Compounds: A Series Of Monographs; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1971.
- (2) Richardson, P. M.; Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Volume 42.*; 2006; Vol. 35.
- (3) Lazúrová, Z.; Mitro, P. *Vnitř Lék* **2017**, 63 (9), 617–623.
- (4) Borea, P. A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, 174 (13), 1945–1960.
- (5) Koolman, J. *Barevný atlas biochemie*; Grada, 2012.
- (6) Watanabe, F.; Katsura, H.; Takenaka, S.; Fujita, T.; Abe, K.; Tamura, Y.; Nakatsuka, T.; Nakano, Y. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (11), 4736–4741.
- (7) Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Tanioka, Y.; Bito, T. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (28), 6769–6775.
- (8) Miller, C. O.; Skoog, F.; Von Saltza, M. H.; Strong, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77 (5), 1392.
- (9) Frébort, I.; Kowalska, M.; Hluska, T.; Frébortová, J.; Galuszka, P. *J. Exp. Bot.* **2011**, 62 (8), 2431–2452.
- (10) Zürcher, E.; Müller, B. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Elsevier Inc., 2016; Vol. 324, pp 1–38.
- (11) Koprna, R.; De Diego, N.; Dundálková, L.; Spíchal, L. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, 24 (3), 484–492.
- (12) Rawal, R. K.; Bariwal, J.; Singh, V. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, 16 (28), 3258–3273.
- (13) Jung, Y. H.; Kim, S. I.; Hong, Y. J.; Park, S. J.; Kang, K. T.; Kim, S. Y.; Kim, I. S. *Tetrahedron* **2015**, 71 (7), 1068–1073.
- (14) De Clerq, E. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, 17 (1), 625–634.
- (15) Hynek, P. *Prakt. Lékař.* **2014**, 10 (5), 161–165.
- (16) Reyes, E. *Future Cardiol.* **2016**, 12 (1), 59–67.
- (17) Ogilvie, K. K.; Nguyen-Ba, N.; Gillen, M. F.; Radatus, B. K.; Cherian, U. O.; Hanna, H. R.; Smith, K. O.; Galloway, K. S. *Can. J. Chem.* **1984**, 62 (2), 241–252.
- (18) Ogilvie, K. K.; Hanna, H. R. *Can. J. Chem.* **1984**, 62 (12), 2702–2706.

- (19) Bailey, S.; Harnden, M. R. *Nucleosides and Nucleotides* **1987**, 6 (3), 555–574.
- (20) Jaehne, G.; Kroha, H.; Mueller, A.; Helsberg, M.; Winkler, I.; Gross, G.; Scholl, T. *Angew. Chemie* **1994**, 106 (5), 603–605.
- (21) Reymen, D.; Naesens, L.; Balzarini, J.; Holý, A.; Dvořáková, H.; De Clercq, E. *Antiviral Res.* **1995**, 28 (4), 343–357.
- (22) Neyts, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Jahne, G.; Winkler, I.; Helsberg, M.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (12), 2710–2716.
- (23) Neyts, J.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Chaoyong, Z.; Snoeck, R.; Zimmermann, A.; Mertens, T.; Karlsson, A.; De Clercq, E. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 53 (1), 157–165.
- (24) Neyts, J.; Clercq, E. D. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45 (1), 84–87.
- (25) Clercq, E. De; Neyts, J. *Rev. Med. Virol* **2004**, 14, 289–300.
- (26) Hakimelahi, G. H.; Ly, T. W.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Jain, M. L.; Zakerinia, M.; Davari, H.; Mei, H.-C.; Sambaiah, T.; Moshfegh, A. A.; Hakimelahi, S. *J. Med. Chem.* **2001**, 44 (22), 3710–3720.
- (27) Fuji, T.; Itaya, T.; Ogawa, K. *Heterocycles* **1997**, 44 (1), 573–592.
- (28) Bzowska, A.; Ananiev, A. V.; Shugar, D. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48 (5), 937–947.
- (29) Peifer, C.; Hauser, D.; Bühler, S.; Totzke, F.; Laufer, S.; Kinkel, K.; Schächtele, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 44 (4), 1788–1793.
- (30) Marcelo, F.; Silva, F. V. M.; Goulart, M.; Justino, J.; Sinaý, P.; Blériot, Y.; Rauter, A. P. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, 17 (14), 5106–5116.
- (31) Schwarz, S.; Rauter, A. P.; Csuk, R.; Xavier, N. M.; Vaz, P. D. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (13), 2770–2779.
- (32) Schwarz, S.; Csuk, R.; Rauter, A. P. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (15), 2446–2456.
- (33) Schwarz, S.; Siewert, B.; Csuk, R.; Rauter, A. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 90, 595–602.
- (34) Xavier, N. M.; Goncalves-Pereira, R.; Jorda, R.; Aezníčková, E.; Kryštof, V.; Oliveira, M. C. *Pure Appl. Chem.* **2017**, 89 (9), 1267–1281.
- (35) Xavier, N. M.; Lucas, S. D.; Jorda, R.; Schwarz, S.; Loesche, A.; Csuk, R.; Oliveira, M. C. *Synlett* **2015**, 26 (19), 2663–2672.
- (36) Dimopoulou, A.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Gkizis, P.; Coutouli-Argyropoulou, E.; Schols, D.; Komiotis, D. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, 34 (4), 289–308.
- (37) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-deana, A.; Pinna, L.; Letham, D.

- S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771–786.
- (38) Voller, J.; Zatloukal, M.; Lenobel, R.; Doležal, K.; Béréš, T.; Kryštof, V.; Hajdúch, M.; Strnad, M.; Spíchal, L.; Niemann, P.; Džubák, P. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1350–1359.
- (39) Burmudžija, A.; Marković, S.; Muškinja, J.; Pejović, A.; Tošović, J. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2018**, *123* (1), 201–214.
- (40) Doležal, R. *Kvantitativní vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou vybraných potenciálních antituberkulotik*; 2008.
- (41) Mayr, H.; Breugst, M.; Ofial, A. R. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (29), 6470–6505.
- (42) Smith, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry*, 6th ed.; 2007.
- (43) Breugst, M.; Bautista, F. C.; Mayr, H. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 127–137.
- (44) Stachowicz-Kusnierz, A.; Korchowiec, J. *Struct. Chem.* **2015**, *27* (2), 543–555.
- (45) Levy, D. E.; Fügedi, P. *The Organic Chemistry of Sugars*; 2006.
- (46) Fischer, E.; Helferich, B. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1914**, *47* (1), 210–235.
- (47) Blackburn, G. M. *Nucleic acid in Chemistry and Biology*; 2006.
- (48) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of nucleoside synthesis*; 2001.
- (49) Novosjolova, I.; Bizděna, E.; Turks, M. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (48), 6557–6561.
- (50) Kawakami, H.; Matsushita, H.; Naoi, Y.; Itoh, K.; Yoshikoshi, H. *Chem. Lett.* **1989**, *18* (2), 235–238.
- (51) Kazimierczuk, Z.; Cottam, H. B.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (21), 6379–6382.
- (52) Cowley, D. E.; Duke, C. C.; Liepa, A. J.; Macleod, J. K.; Letham, D. S. *Aust. J. Chem.* **1978**, *31* (5), 1095–1111.
- (53) Sugiyama, T.; Hashizume, T. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42* (9), 1791–1792.
- (54) Montgomery, J. A.; Hewson, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1* (4), 213–214.
- (55) Iwamura, H.; Hashizume, T. *J. Org. Chem.* **1968**, *33* (5), 1796–1799.
- (56) Iwamura, H.; Miyakado, M.; Hashizume, T. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27* (1), 149–156.
- (57) Birkofer, L.; Ritter, A.; Köhlthau, H. P. *Angew. Chemie* **1963**, *75* (4), 209–210.
- (58) Guarcello, V.; Rais, R. H.; Chu, C. K.; Naguib, F. N. M.; Yadav, V.; Al Safarjalani, O. N. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (8), 1987–1996.
- (59) de Groote, M.; Lorenzen, A.; van der Klein, P. A. M.; van Tilburg, E. W.; von Frijtag

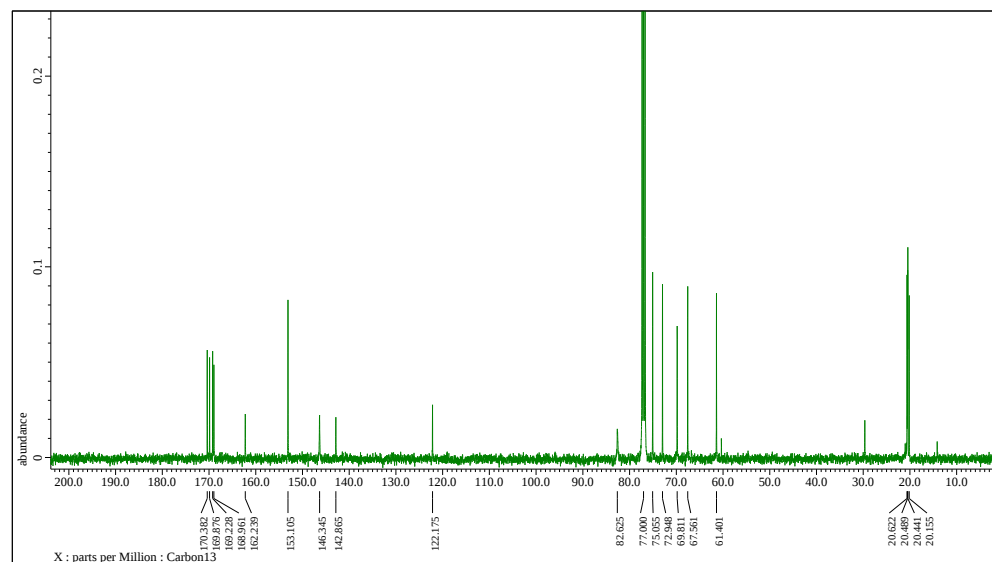
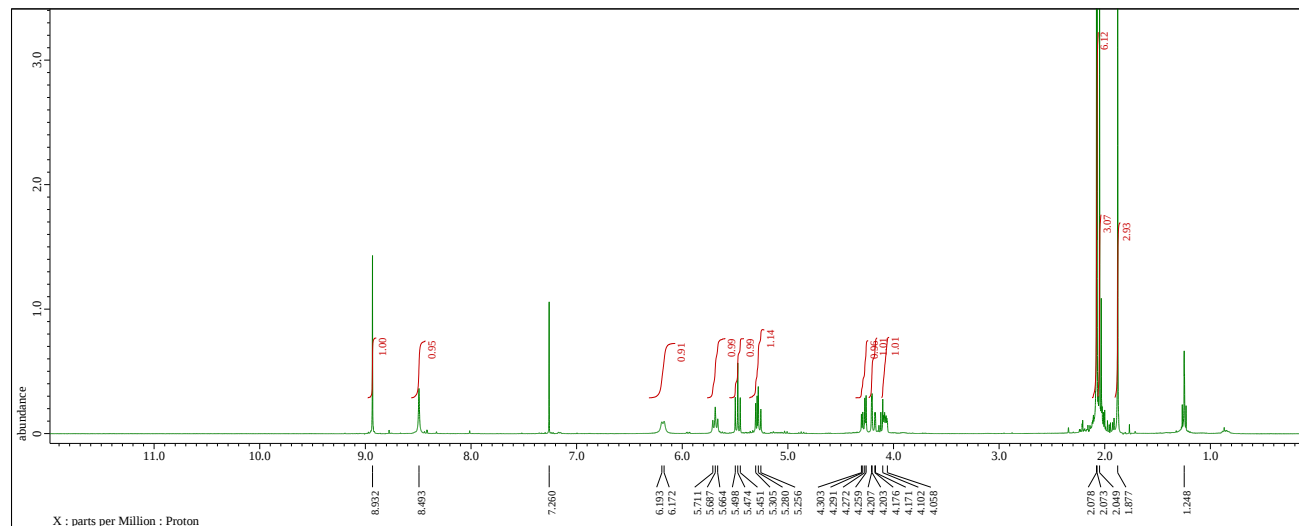
- Drabbe Künzel, J.; Stannek, C.; IJzerman, A. P. *J. Med. Chem.* **2002**, *44* (18), 2966–2975.
- (60) Bookser, B. C.; Raffaele, N. B.; Therapeutics, M.; Torrey, N.; Road, P.; Jolla, L. **2007**, No. 2, 173–179.
- (61) Imazawa, M.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (15), 3044–3048.
- (62) Votruba, I.; Holy, A.; Dvořáková, H.; Hockova, D.; Hrebabecky, H.; Ihlar, T. C.; Asojickova, M. M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1994**, *59*, 2303–2330.
- (63) Murakami, K.; Shirasaka, T.; Yoshioka, H.; Kojima, E.; Aoki, S.; Ford, H.; Driscoll, J. S.; Kelley, J. A.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (5), 1606–1612.
- (64) Abad, J. L.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (18), 6575–6582.
- (65) Shallop, A. J.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (22), 8657–8661.
- (66) Tranová, L.; Buček, J.; Zatloukal, M.; Cankař, P.; Stýskala, J. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2019**, *62* (3), 118–125.
- (67) Eletskaia, B. Z.; Gruzdev, D. A.; Krasnov, V. P.; Levit, G. L.; Kostromina, M. A.; Paramonov, A. S.; Kayushin, A. L.; Muzyka, I. S.; Muravyova, T. I.; Esipov, R. S.; Andronova, V. L.; Galegov, G. A.; Charushin, V. N.; Miroshnikov, A. I.; Konstantinova, I. *D. Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, 1–12.
- (68) Hildebrand, C.; Wright, G. E. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (6), 1808–1813.
- (69) Blackburn, G. M.; Johnson, A. W. *J. Chem. Soc.* **1960**, *1*, 4358–4365.
- (70) Rousseau, R. J.; Robins, R. K.; Townsend, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (10), 2661–2668.
- (71) Rousseau, R. J.; Panzica, R. P.; Reddick, S. M.; Robins, R. K.; Townsend, L. B. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (3), 631–635.
- (72) Cowley, D. E.; Jenkins, I. D.; Macleod, J. K.; Summons, R. E.; Letham, D. S.; Wilson, M. M.; Parker, C. W. *Tetrahedron Lett.* **1975**, No. 12, 1015–1018.
- (73) Duke, C. C.; Liepa, A. J.; MacLeod, J. K.; Letham, D. S.; Parker, C. W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, *1* (24), 964.
- (74) Kotek, V.; Chudíková, N.; Tobrman, T.; Dvořák, D. *Org. Lett.* **2010**, *12* (24), 5724–5727.
- (75) Kotek, V.; Tobrman, T.; Dvořák, D. *Synthesis (Stuttg.)* **2012**, *44* (4), 610–618.
- (76) Maryška, M.; Chudíková, N.; Kotek, V.; Dvořák, D.; Tobrman, T. *Monatshefte für Chemie* **2013**, *144* (4), 501–507.
- (77) Garner, P.; Ramakanth, S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (6), 1294–1298.

- (78) Garner, P.; Yoo, J. U.; Sarabul, R. *Tetrahedron* **1992**, 48 (21), 4259–4270.
- (79) Robins, M. J.; Zou, R.; Guo, Z.; Wnuk, S. F. *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (26), 9207–9212.
- (80) Lichtenthaler, F. W.; Voss, P.; Heerd, A. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15 (24), 2141–2144.
- (81) Poopeiko, N. E.; Kvasyuk, E. I.; Mikhailopulo, I. A.; Lidaks, M. J. *Synthesis (Stuttg)*. **1985**, 1985 (6/7), 605–609.
- (82) Ness, R. K.; Fletcher, H. G.; Hudson, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72 (5), 2200–2205.
- (83) Fiandor, J.; García-López, M. T.; De Las Heras, F. G.; Méndez-Castrillón, P. P. *Synthesis (Stuttg)*. **1985**, 1985 (12), 1121–1123.
- (84) Salinas, A. E.; Sproviero, J. F.; Deulofeu, V. *Carbohydr. Res.* **1987**, 170, 71–99.
- (85) Studentsov, E. P.; Sokolov, V. M.; Zakharov, V. I. *Russ. J. Gen. Chem.* **1995**, 65 (2), 276.
- (86) Moreau, C.; Kirchberger, T.; Swarbrick, J. M.; Bartlett, S. J.; Fliegert, R.; Yorgan, T.; Bauche, A.; Harneit, A.; Guse, A. H.; Potter, B. V. L. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (24), 10079–10102.
- (87) Christensen, H.; Christiansen, M. S.; Petersen, J.; Jensen, H. H. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (18), 3276–3283.
- (88) Bertho, J. N.; Coué, A.; Ewing, D. F.; Goodby, J. W.; Letellier, P.; Mackenzie, G.; Plusquellec, D. *Carbohydr. Res.* **1997**, 300 (4), 341–346.
- (89) Masuko, S.; Bera, S.; Green, D. E.; Weïwer, M.; Liu, J.; Deangelis, P. L.; Linhardt, R. J. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (3), 1449–1456.
- (90) Robyt, J. F. *Essentials of Carbohydrate Chemistry*; Springer Advanced Texts in Chemistry; Springer New York: New York, NY, 1998.
- (91) Boons, G. J. In *Organic Synthesis with Carbohydrates*; Sheffield Academic Press Ltd: Sheffield, UK, 2008; pp 1–25.
- (92) Aguilera, B.; Fernández-Mayoralas, A.; Jaramillo, C. *Tetrahedron* **1997**, 53 (16), 5863–5876.
- (93) Acharya, S. AyuVis Research LLC. U.S. Patent. US2017/281667 A1, 2017.
- (94) Knapp, S.; Huhn, R. A.; Amorelli, B. *Org. Synth.* **2007**, 84, 68–76.
- (95) Liang, C.; Ju, W.; Ding, S.; Sun, H.; Mao, G. *Molecules* **2017**, 22 (1), 84.
- (96) Šardžík, R.; Noble, G. T.; Weissenborn, M. J.; Martin, A.; Webb, S. J.; Flitsch, S. L. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, 699–703.
- (97) Zhai, Y.; Dasog, M.; Snitynsky, R. B.; Purkait, T. K.; Aghajamali, M.; Hahn, A. H.; Sturdy,

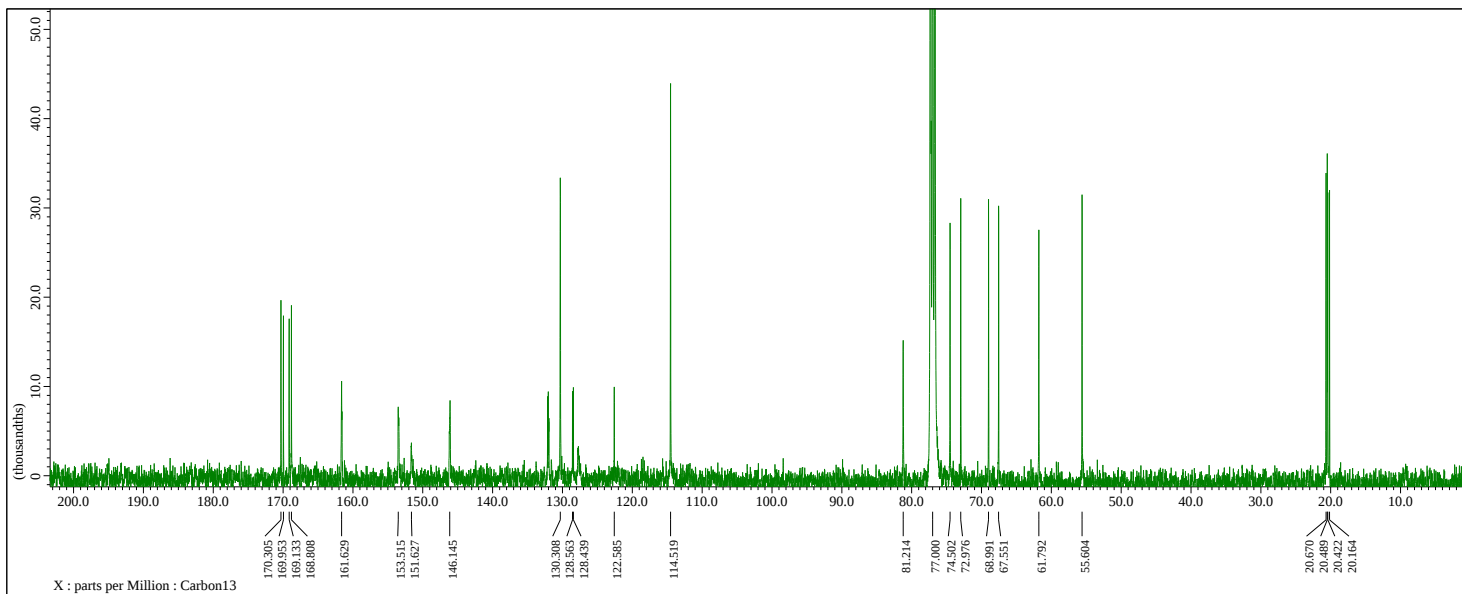
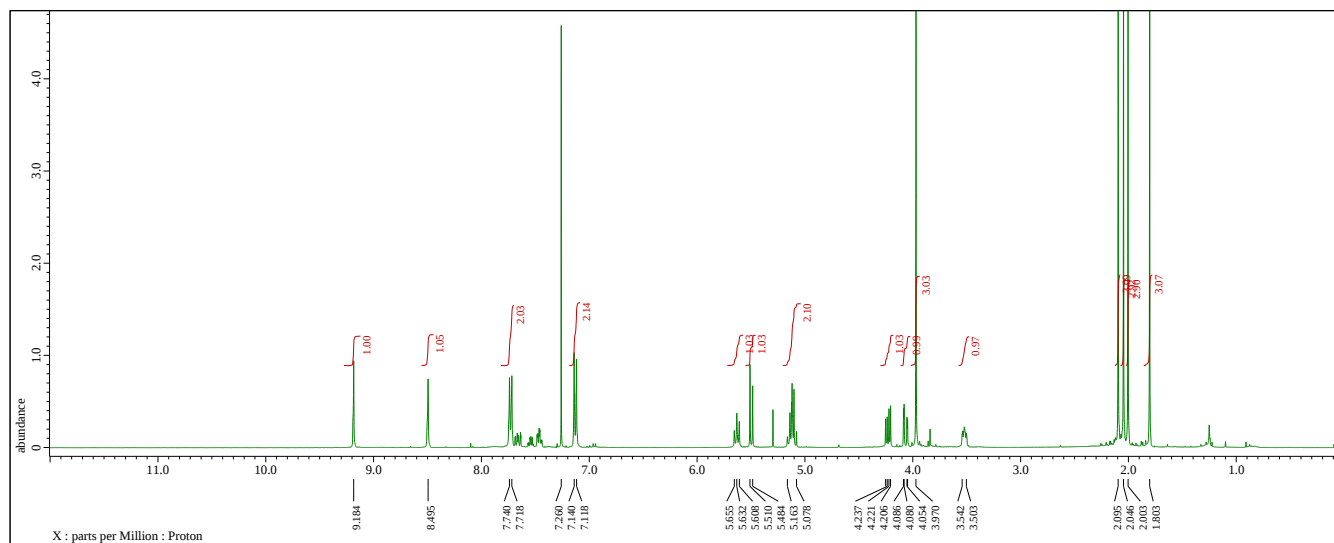
- C. B.; Lowary, T. L.; Veinot, J. G. C. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (47), 8427–8433.
- (98) Percec, V.; Leowanawat, P.; Sun, H. J.; Kulikov, O.; Nusbaum, C. D.; Tran, T. M.; Bertin, A.; Wilson, D. A.; Peterca, M.; Zhang, S.; Kamat, N. P.; Vargo, K.; Moock, D.; Johnston, E. D.; Hammer, D. A.; Pochan, D. J.; Chen, Y.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Bergeron-Brlek, M.; André, S.; Roy, R.; Gabius, H. J.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (24), 9055–9077.
- (99) Pedersen, D.; Rosenbohm, C. *Synthesis (Stuttg.)* **2004**, 16, 2431.
- (100) Meier, L.; Monteiro, G. C.; Baldissera, R. A. M.; Sá, M. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21 (5), 859–866.
- (101) Kelley, J. L.; Morris Bullock, R.; Krochmal, M. P.; McLean, E. W.; Linn, J. A.; Durcan, M. J.; Cooper, B. R. *J. Med. Chem.* **1997**, 40 (20), 3207–3216.
- (102) Brito-Arias, M. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*; Springer International Publishing: Cham, 2016; Vol. 30, pp 369–389.
- (103) Bubb, W. A. *Concepts Magn. Reson.* **2003**, 19A (1), 1–19.
- (104) Humeník, M.; Dzurilla, M.; Kutschý, P.; Solčániová, E.; Kováčik, V.; Bekešová, S. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2004**, 69 (8), 1657–1674.
- (105) Tuncbilek, M.; Bilget Guven, E.; Onder, T.; Cetin Atalay, R. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (7), 3058–3065.
- (106) Tuncbilek, M.; Kucukdumlu, A.; Guven, E. B.; Altiparmak, D.; Cetin-Atalay, R. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, 28 (3), 235–239.
- (107) Schwarz, S.; Csuk, R.; Rauter, A. P. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (15), 2446–2456.
- (108) Lichtenthaler, F. W.; Kitahara, K. *Angew. Chemie* **1975**, 87 (23), 839–840.
- (109) Caner, J.; Vilarrasa, J. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (14), 4880–4883.

7. Prílohy

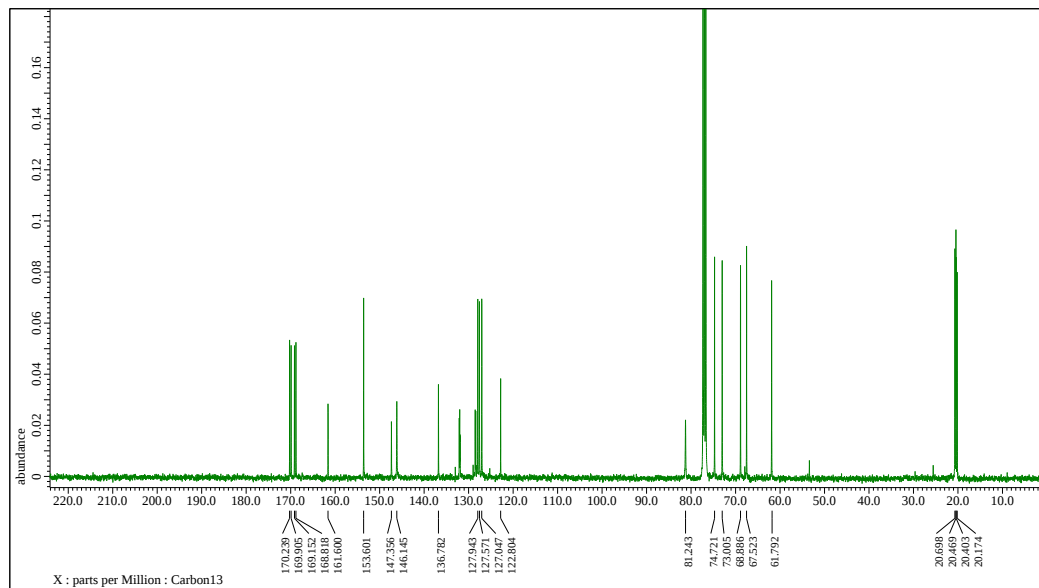
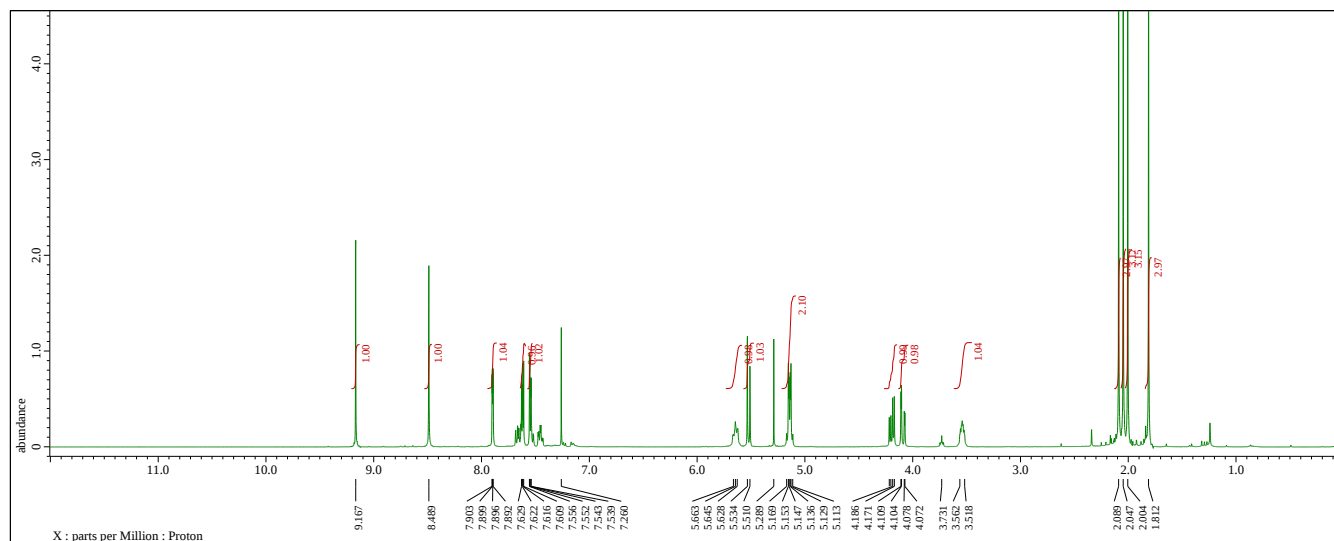
6-chlórpurín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (87)



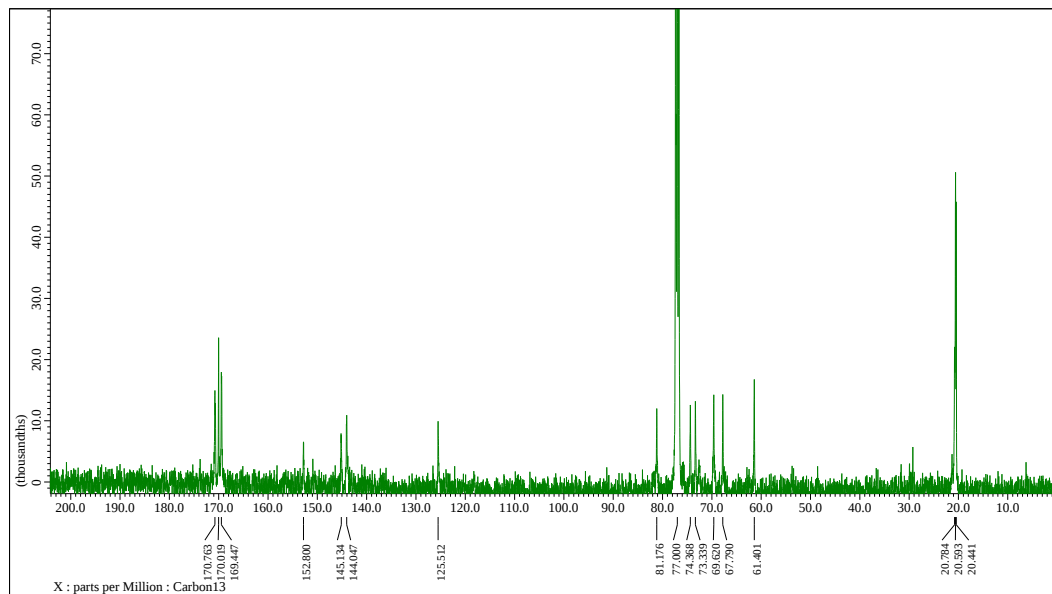
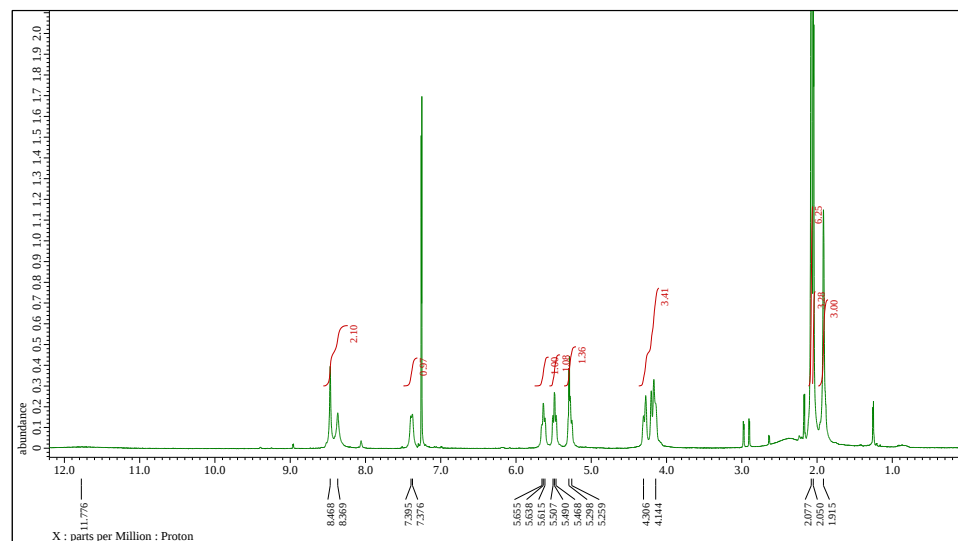
6-(4-metoxyfenyl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (132)



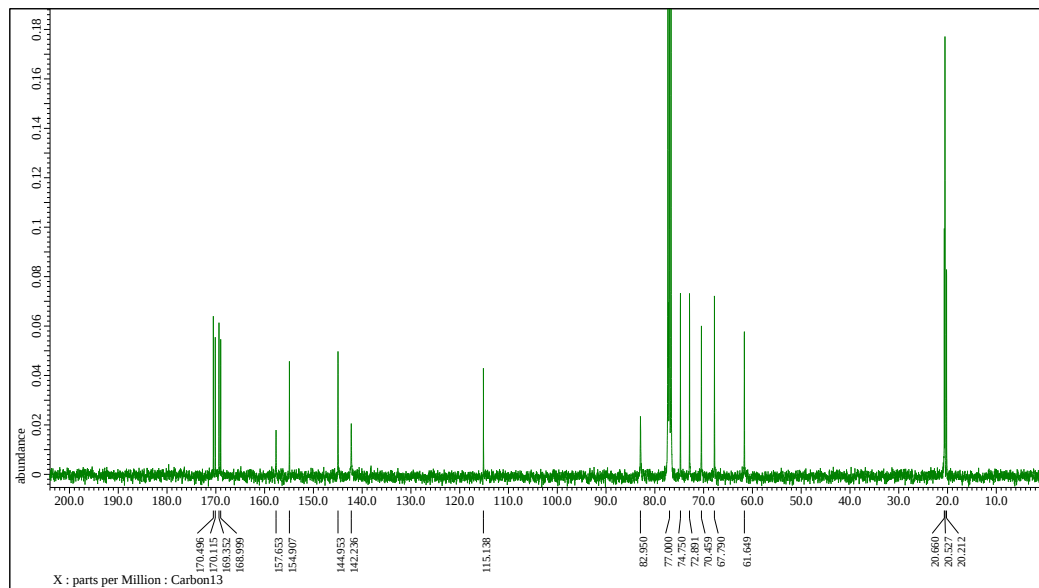
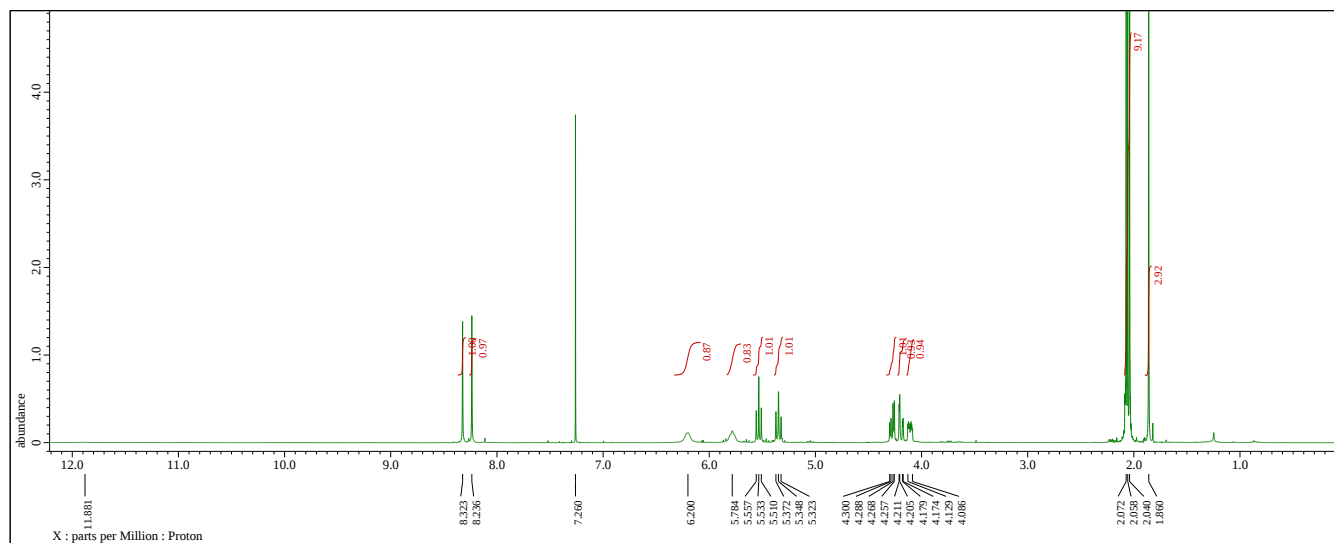
6-(tiofén-3-yl)purín-7-β-D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (133)



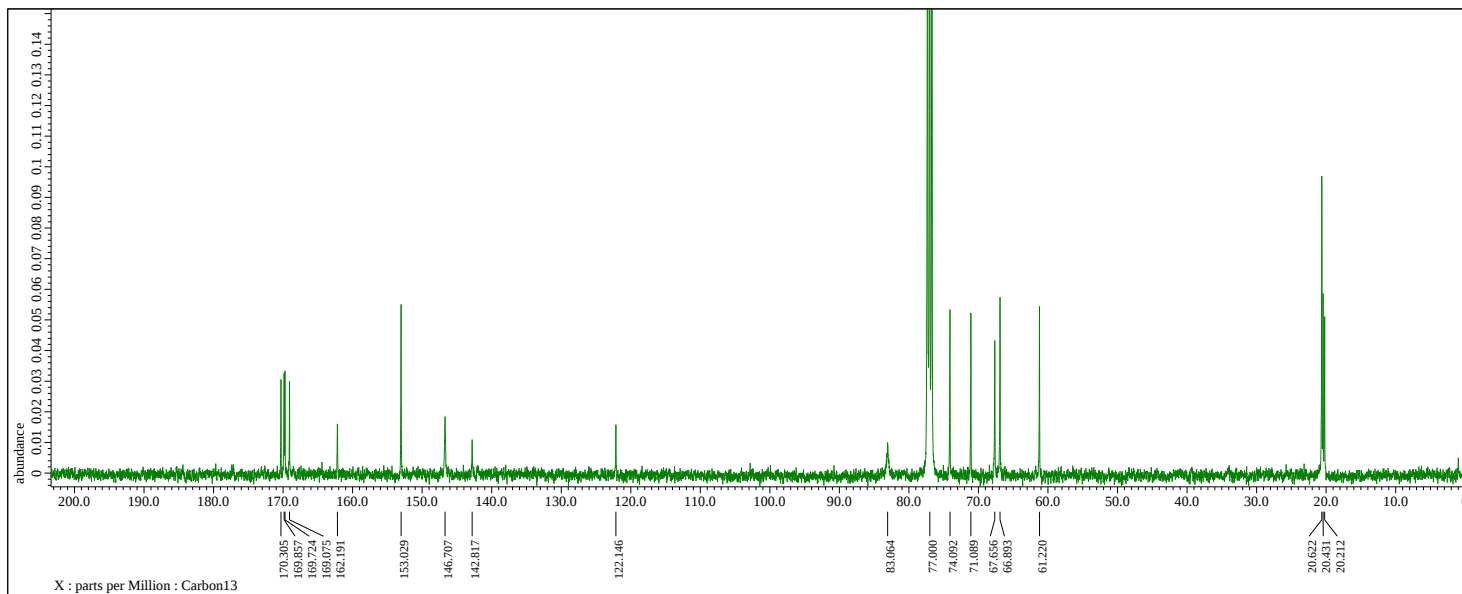
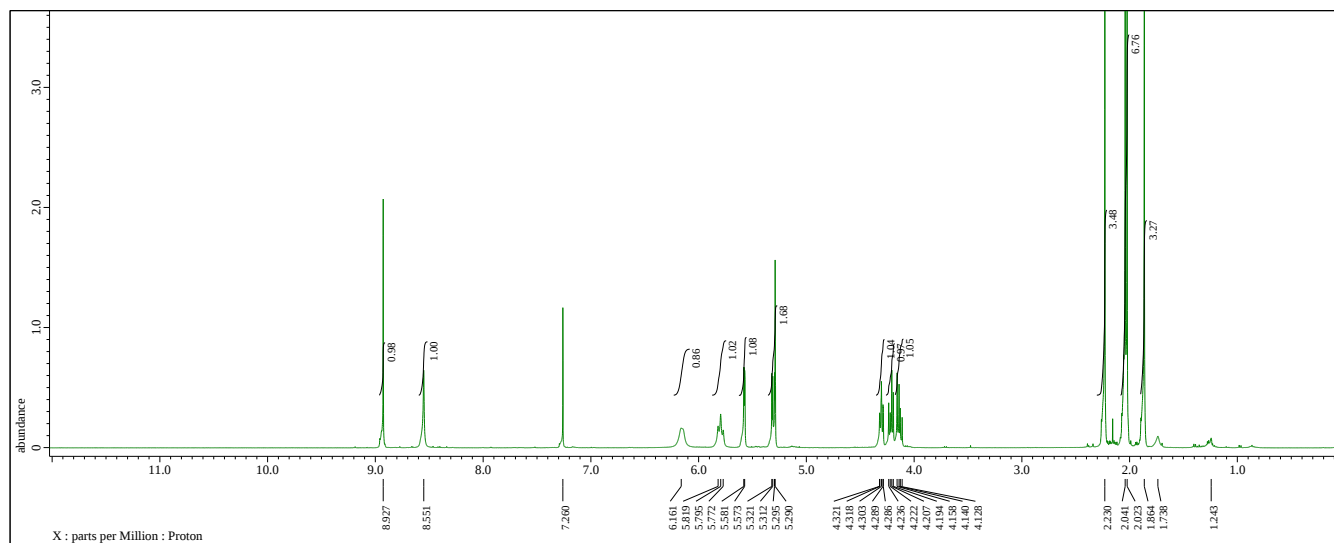
6-merkaptopurin-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (134)



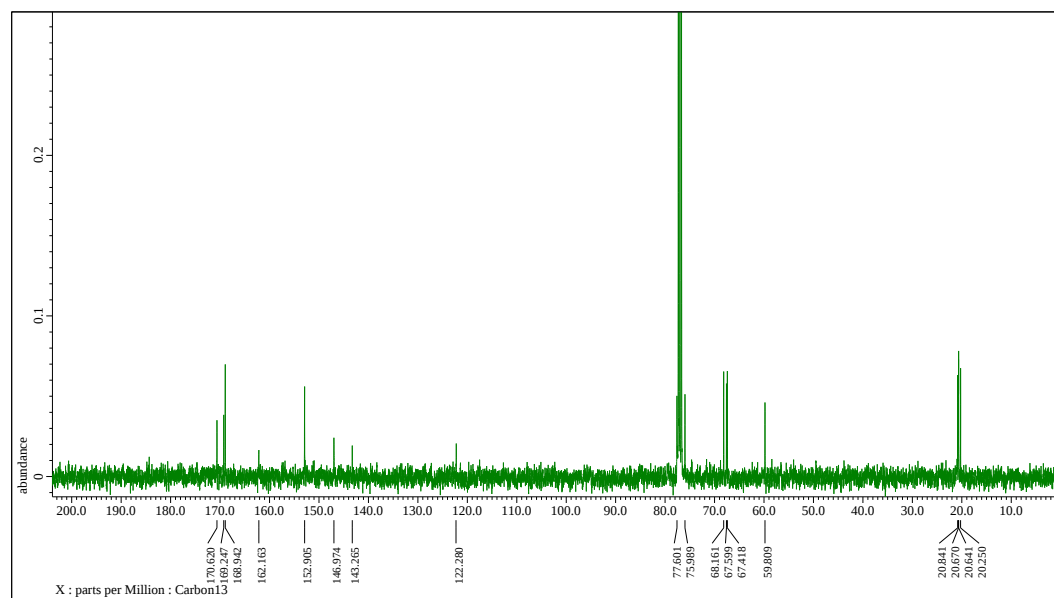
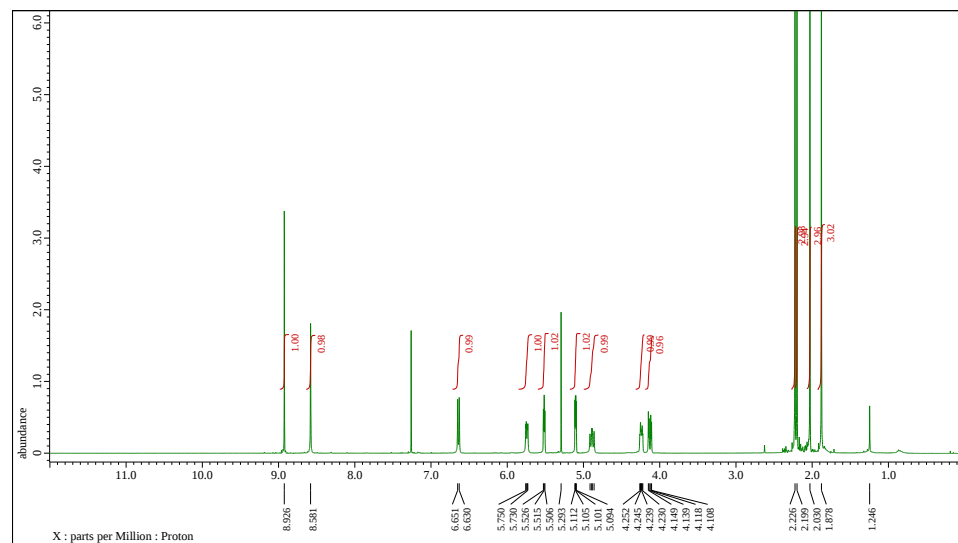
Hypoxantín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (135)



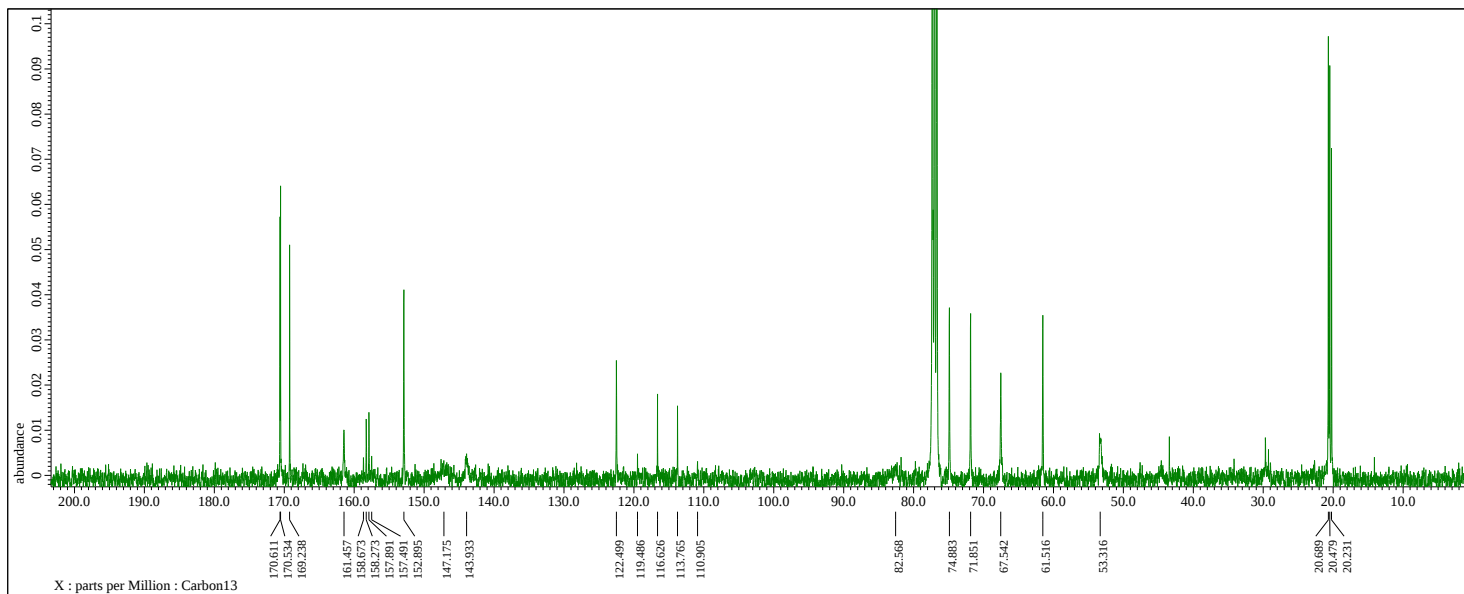
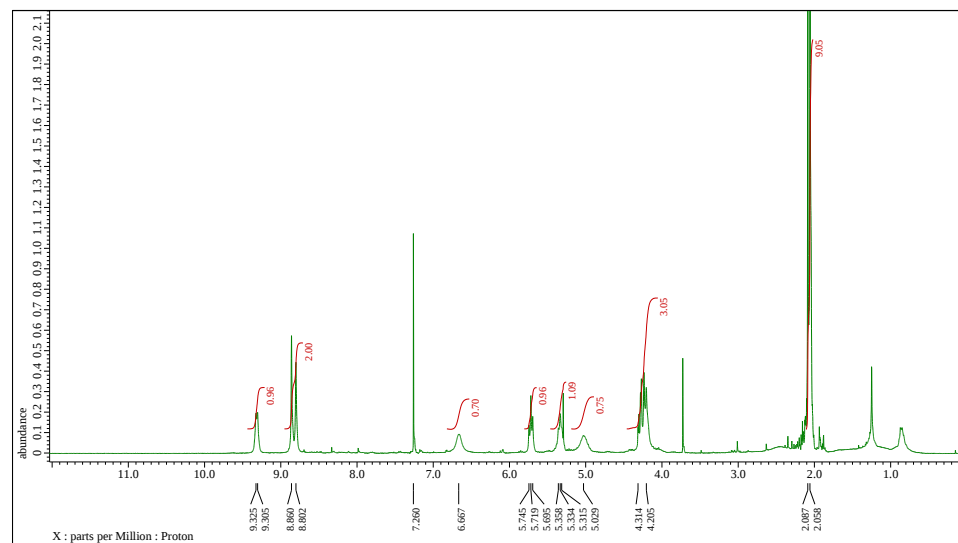
6-chlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (127)



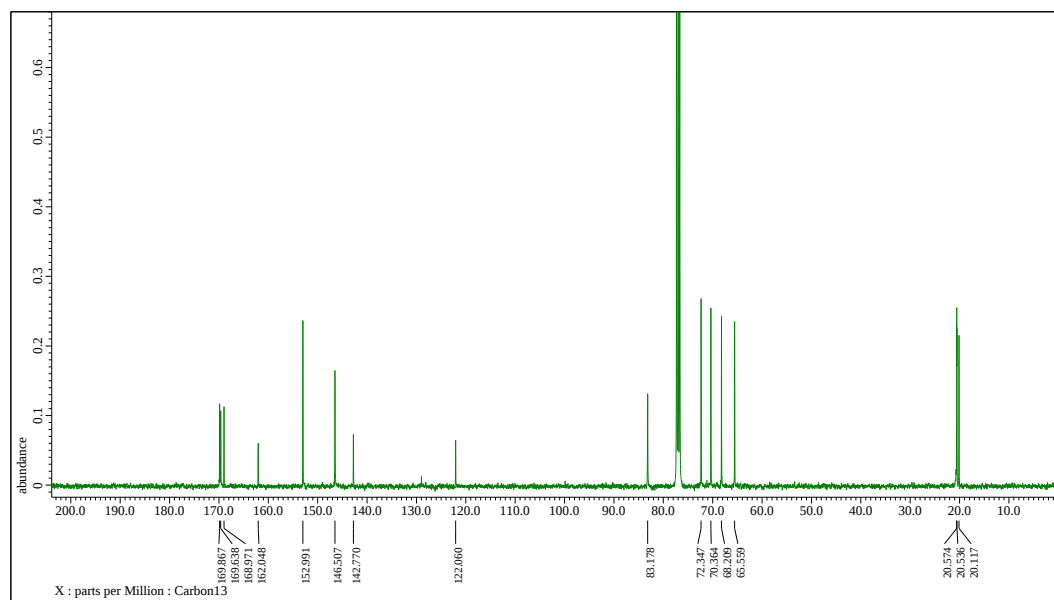
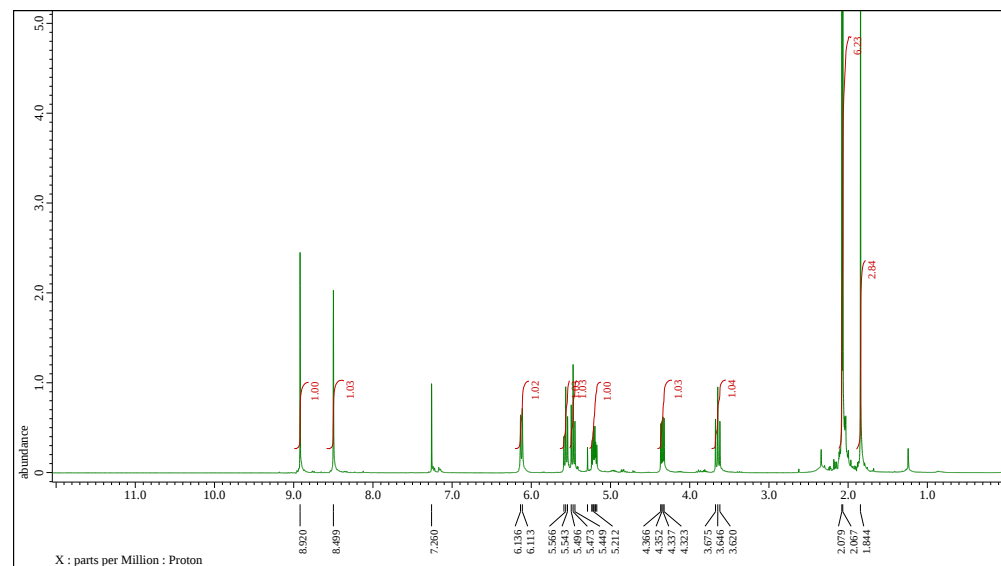
6-chlórpurín-7- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (129)



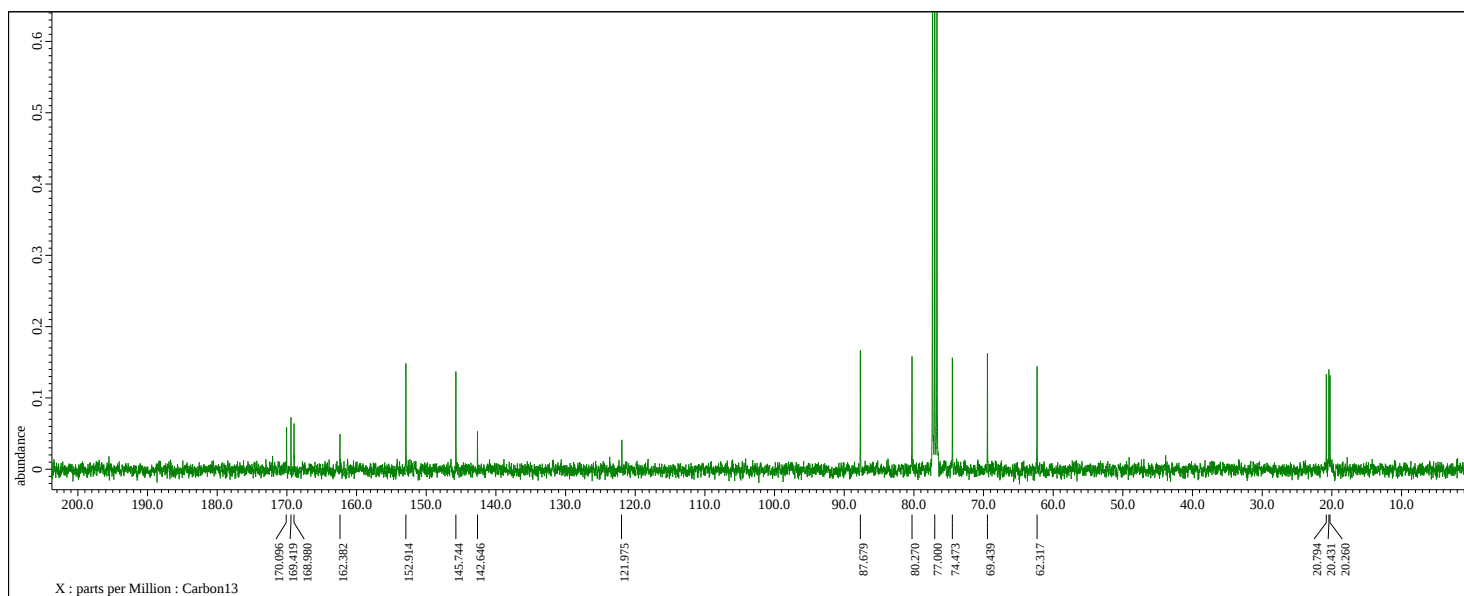
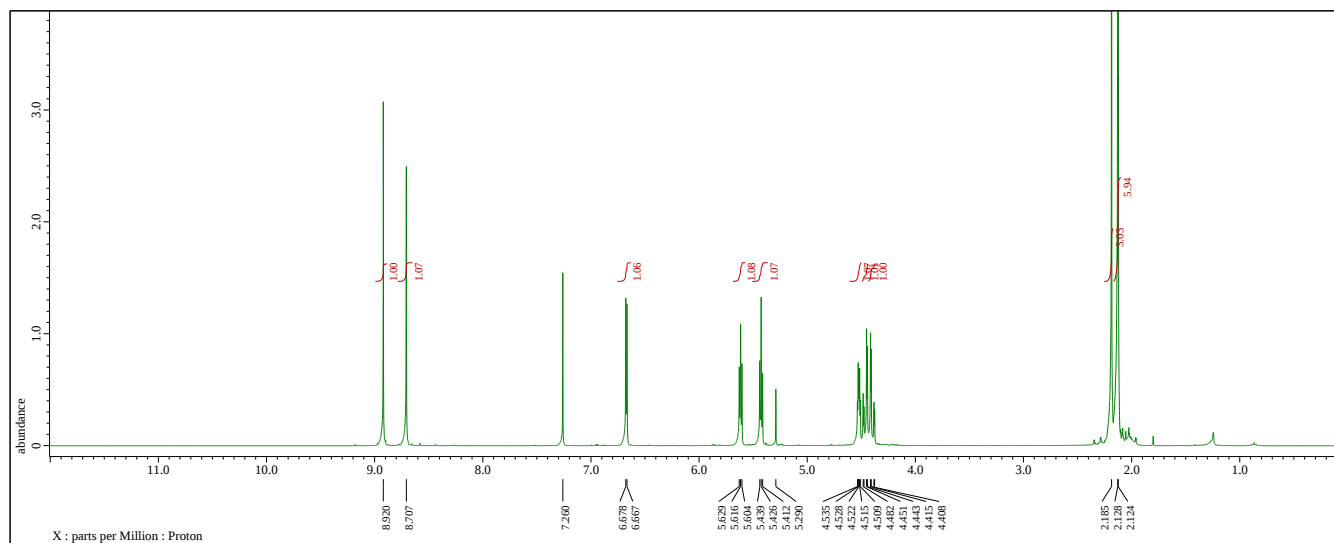
6-chlórpurín-7- β -D-2'-trifluoracetamido-2'-deoxyglukopyranozid-3',4',6'-triacetát (136)



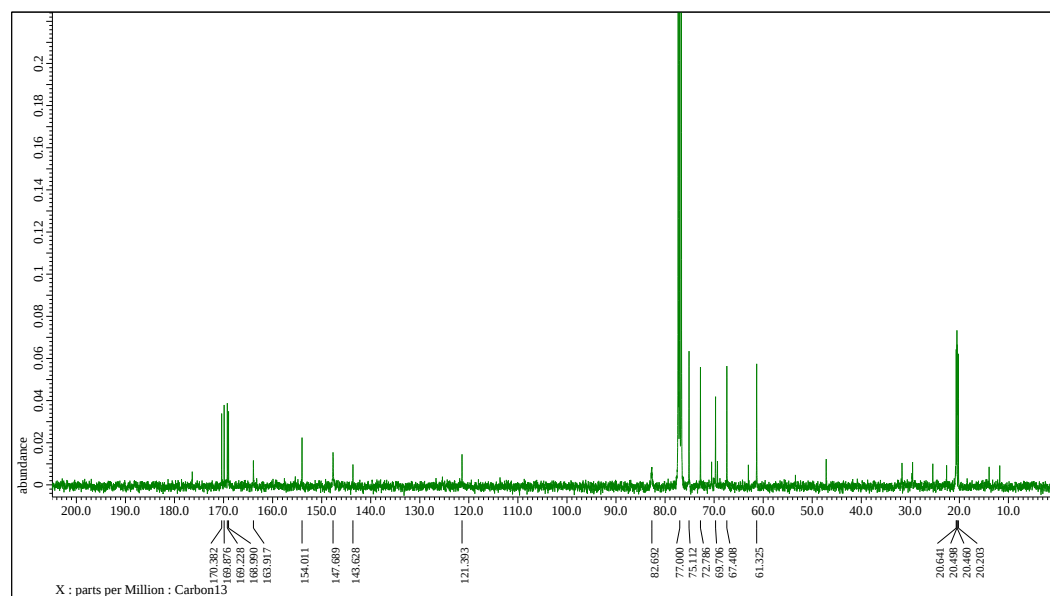
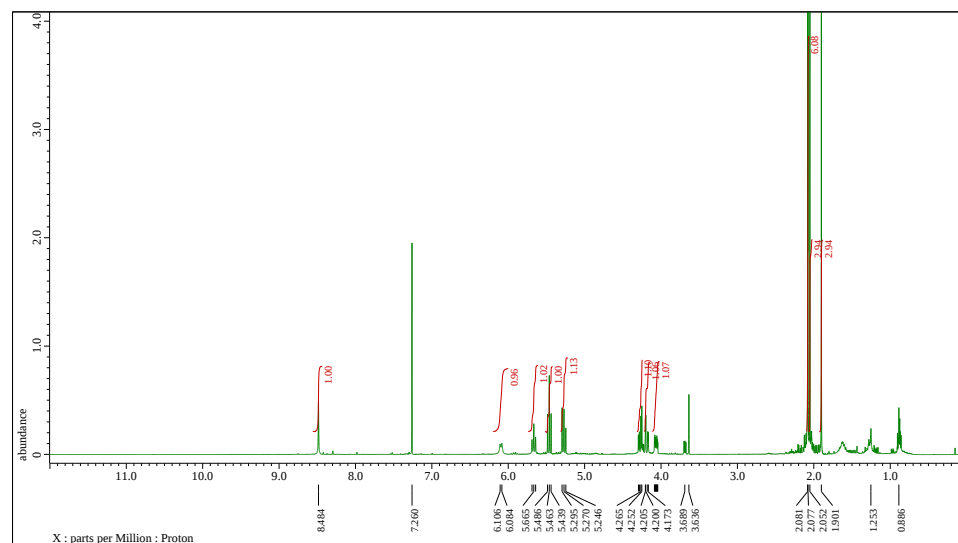
6-chlórpurín-7- β -D-xylopyranozid-2',3',4'-triacetát (128)



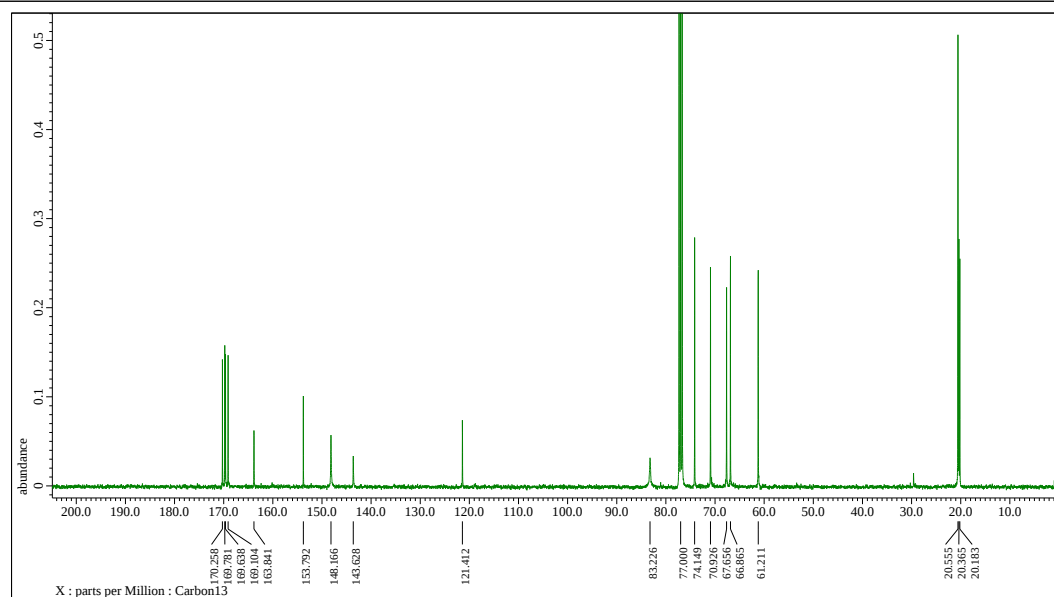
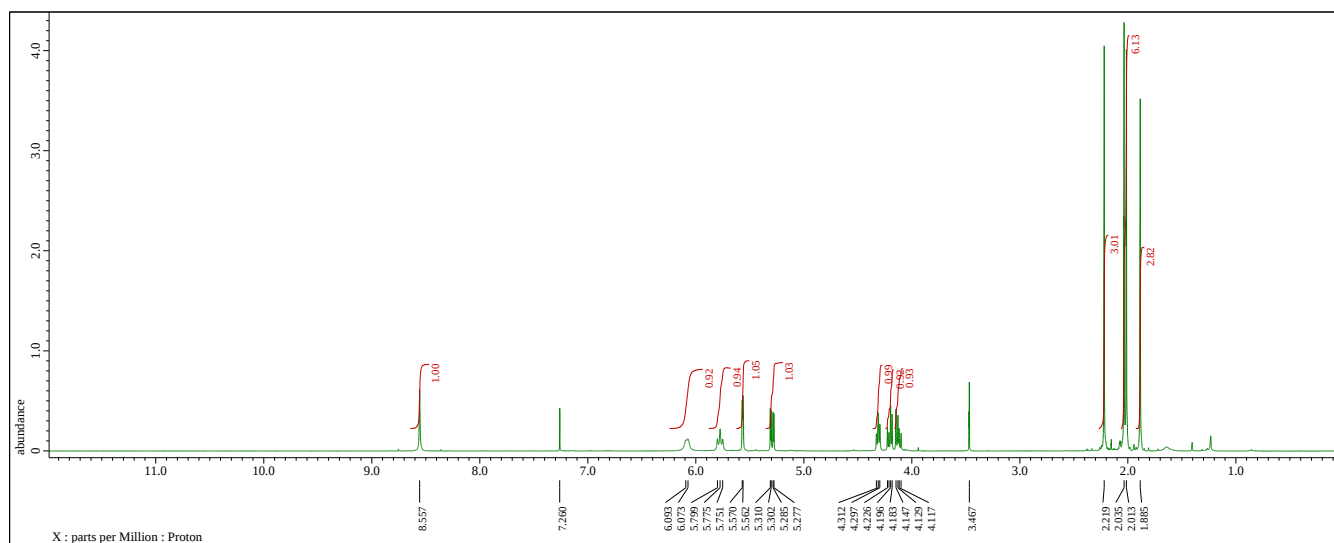
6-chlórpurín-7-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (130)



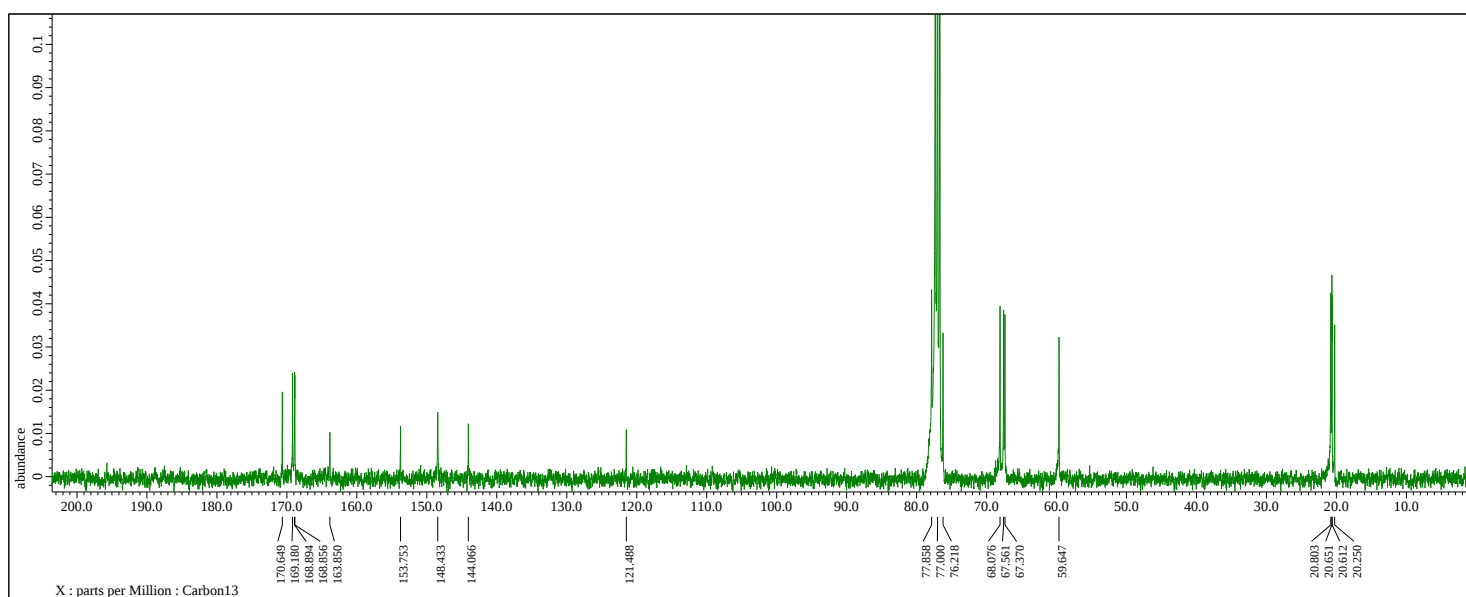
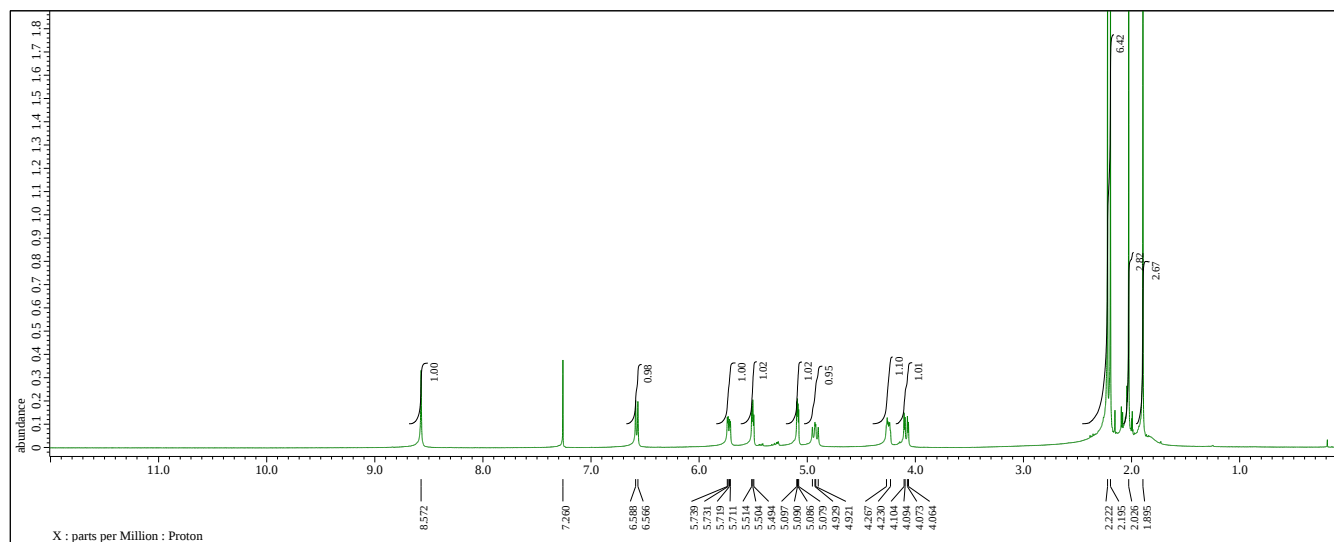
2,6-dichlórpurín-7- β -D-glukopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (137)



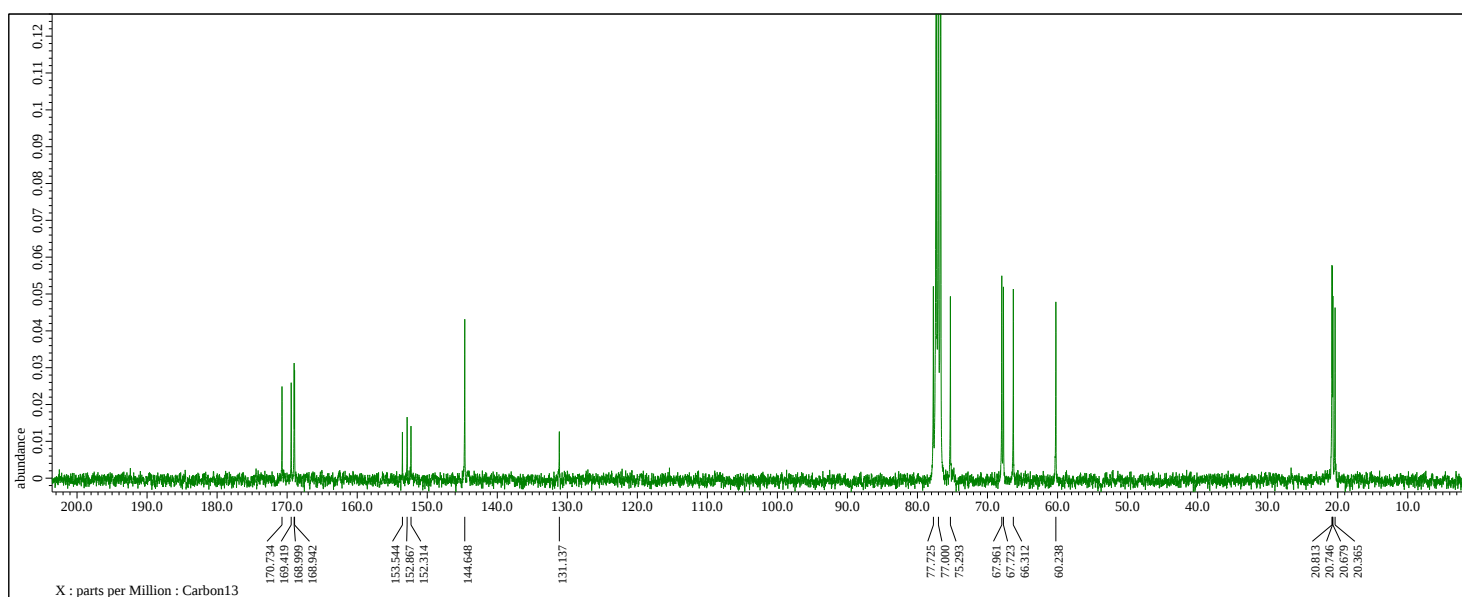
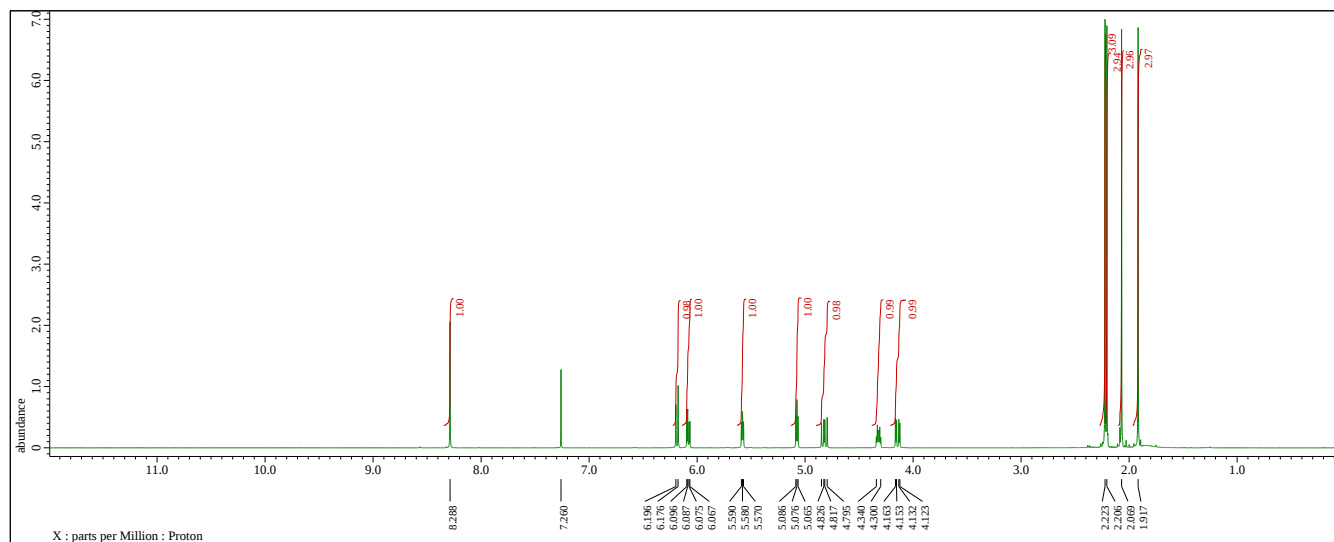
2,6-dichlórpurín-7-β-D-galaktopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (138)



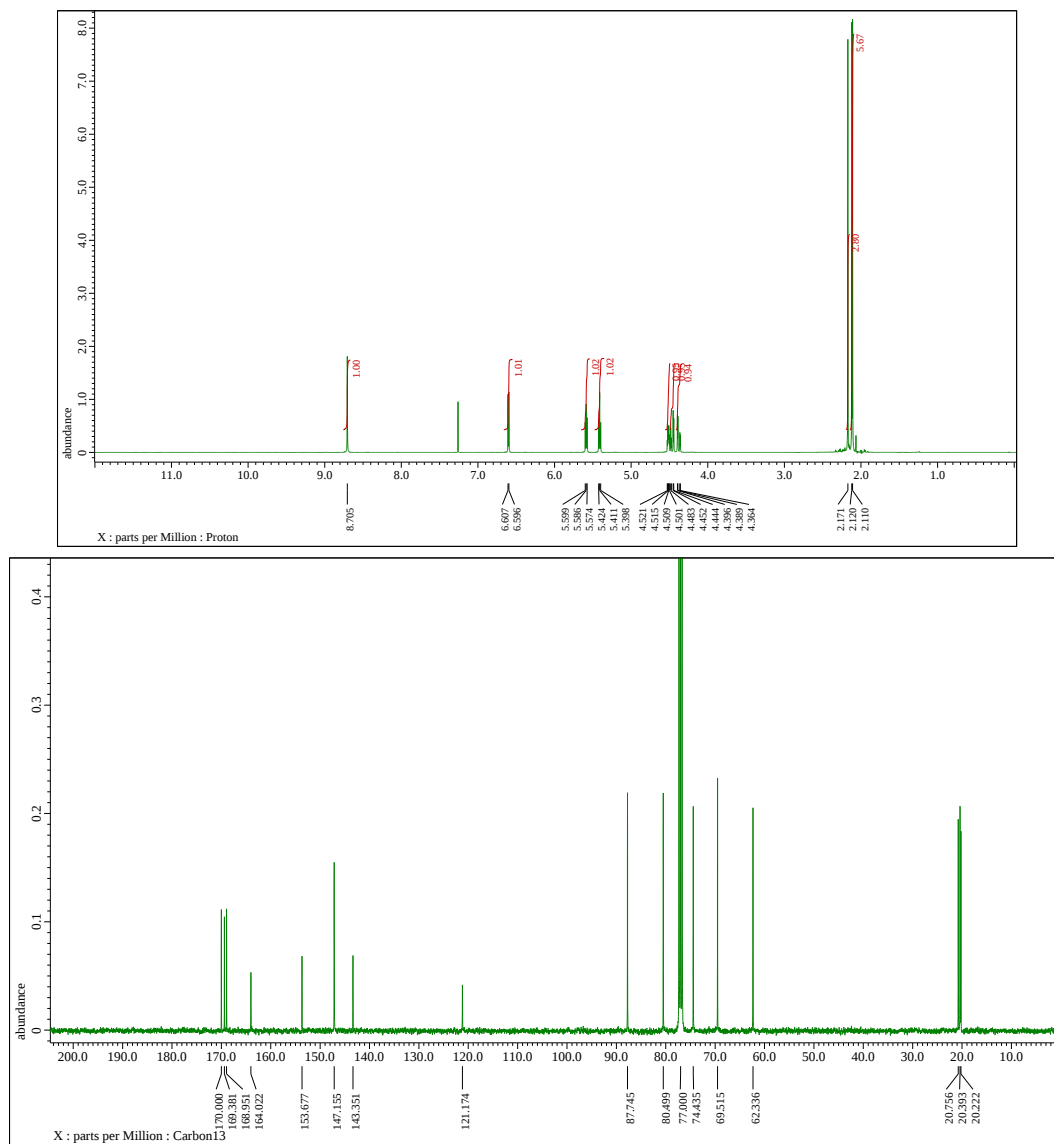
2,6-dichlórpurín-7- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát (139)



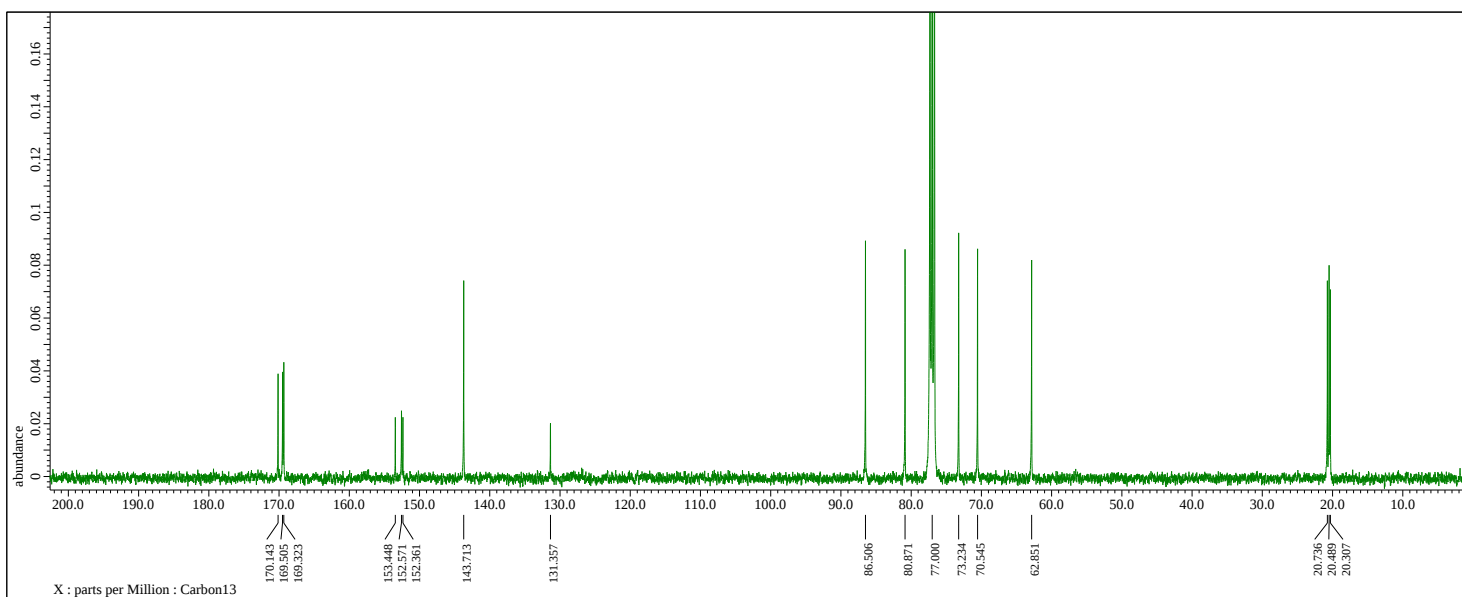
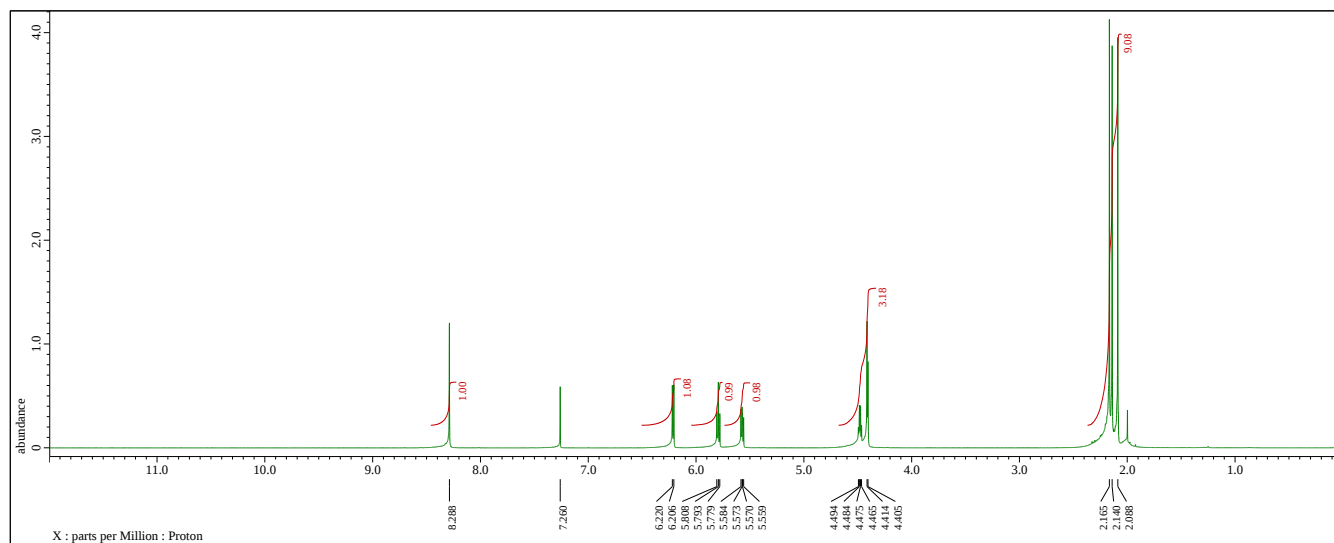
2,6-dichlórpurín-9- α -D-manopyranozid-2',3',4',6'-tetraacetát



2,6-dichlórpurín-7- β -D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát (140)



2,6-dichlórpurín-9-β-D-ribofuranozid-2',3',5'-triacetát



7-*tert*-butyl-6-chlórpurín (120)

