

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2017-237

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.04.2017**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **07.11.2018**
(Věstník č. 45/2018)

- (71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Jana Bíbová, Opava, CZ
Mgr. Václav Mik, Ph.D., Odry, CZ
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ
Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D., Olomouc, CZ
Mgr. Jiří Grúz, Ph.D., Bohuňovice, CZ
Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D., Olomouc, CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr., Hlubočky, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,
Smíchov

(54) Název přihlášky vynálezu:
Deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminu, přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

(57) Anotace:
Řešení se týká N^2, N^6 -disubstituovaných derivátů 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminu, a jejich použití jako léčiv a kosmetik. Sloučeniny podle tohoto řešení vykazují řadu biologických aktivit souvisejících s inhibicí oxidačního stresu, zejména proti stárnutí, protizánětlivé a proti neurodegeneraci. Řešení se rovněž týká kosmetických a farmaceutických přípravků obsahujících tyto deriváty jako aktivní sloučeniny.

CZ 2017 - 237 A3

Deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminu, přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká N^2, N^6 -disubstituovaných derivátů 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminů, jejich použití v kosmetických a medicínských aplikacích a přípravků obsahujících tyto deriváty.

Dosavadní stav techniky

10

Obecně platí, že přírodní cytokininy jsou N^6 -substituované deriváty adeninu. Prvním nalezeným cytokininem byl kinetin (K, N^6 -furfuryladenin), který byl izolován a identifikován v roce 1955 jako produkt degradace DNA; kinetin podporuje buněčné dělení u rostlin. Kinetin byl považován za artefakt, který pochází z autoklávované DNA spermatu sledě nebo vzniká při dlouhodobém skladování DNA. Kinetin, jakož i další cytokininy, mohou být dále substituovány v poloze C2, N3, N7 a N9 purinového kruhu. Nejčastěji se vyskytují N9-nukleosidy a nukleotidy. Chemická struktura kinetinu jasně ukazuje, že reakce adeninového zbytku DNA s furfurem je možným biosyntetickým postupem. Nedávné experimenty ukazují, že furfural, což je oxidovaný cukerný zbytek, je tvořen během oxidačního poškození DNA in vitro. Furfural pochází z hydroxylového radikálu oxidace zbytku deoxyribózy na uhlíku 5', který reaguje s aminoskupinou adeninu, v důsledku čehož tvoří Schiffovu bázi. Dalším intramolekulárním přesmykem se získá kinetin (Barciszewski et al. FEBS Lett 414:457–460, 1997). Tato zjištění naznačují, že kinetin je důležitou součástí nové resyntézy hydroxylových radikálů, které tvoří "sink volných radikálů", což je v souladu s hypotézou, že cytokininy jsou produkty oxidativního metabolismu buňky. Toto je hlavní mechanismus, jakým buňky neutralizují škodlivé vlastnosti reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a reagují na oxidativní stres tím, že indukují molekulární mechanismy obrany a opravy (Barciszewski et al., Int. J. Biol. Macromol. 40: 182-192, 2007). V poslední době byl zkoumán účinek N^6 -benzyladeninu a kinetinu na základní oxidační parametry stresu, jakými jsou aktivity antioxidantních enzymů, redukovaného glutathionu a thiolové skupiny a peroxidace lipidů (Jablonska-Trypuc et al. Mol Cell Biochem 413:97–107, 2016). Antioxidační kapacita čtyř přírodních N^6 -substituovaných derivátů adeninu (cytokininů) byla poprvé hodnocena in vitro pomocí fluorimetrických a spektrofotometrických testů, tj. oxygen radical absorbance capacity (ORAC), trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC) a 2-deoxyribose degradation (2-DRA) testů (Brizzolari et al. J. Chromatogr. B 1019: 164–168, 2016).

35 Za posledních 40 let je oxidační stres stále více uznáván jako faktor přispívající ke stárnutí a k různým formám patofyziologie obecně spojeným se stárnutím. Pohled na oxidační stres je do značné míry "superoxid-centrický", neboť jsme se zaměřili na patologické zdroje těchto od kyslíku odvozených volných radikálů a na druhy molekulárního spouštění, stejně jako na ochranu

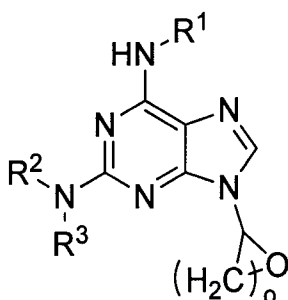
poskytovanou antioxidantními enzymy, zejména superoxid dismutázou, katalázou a glutathion peroxidázou. V posledním desetiletí se pohled na oxidativní stres značně rozšířil, a ten je nyní často viděn jako nerovnováha, která má svůj původ v našich genech a způsobech regulace genové exprese. V centru tohoto nového zaměření je transkripční faktor, tzv. nukleární factor-2 (erythroid-derived 2), nebo Nrf2. Nrf2 je označován jako "hlavní regulátor" antioxidantní reakce, modulující expresi stovek genů, včetně nejen známých antioxidantních enzymů, avšak i velkého množství genů řídících zdánlivě různorodé procesy, např. imunitní a zánětlivé reakce, tkáňové remodelace a fibrózy, karcinogeneze a metastázy, a dokonce i kognitivní dysfunkce a návykové chování. To znamená, že dysregulace Nrf2-regulovaných genů poskytuje logické vysvětlení pro spojení, přímá i nepřímá, mezi pozorovatelným oxidativním stresem a až 200 lidskými nemocemi zahrnujícími různé fyziologické procesy, z nichž v každém se promítá síť zahrnující mnoho genových produktů. Evoluční kooperace těchto mnoha genů pod společnou kontrolou Nrf2 naznačuje, že imunitní a zánětlivé systémy mohou vyžadovat zvýšenou antioxidantní ochranu, na rozdíl od konstitutivního oxidativního stresu vyplývajícího z mitochondriální spotřeby kyslíku pro metabolické účely (Hybertson et al. *Molecular Aspects of Medicine* 32 (2011) 234–246).

Proto je předmětem tohoto vynálezu poskytnout novou generaci analog cytokininů, které vykazují silné antioxidantní vlastnosti a/nebo schopnost regulovat expresi důležitého stresového transkripčního faktoru Nrf2. Nová generace cytokininových sloučenin vykazujících uvedené vlastnosti najde použití v prevenci a léčbě mnoha onemocnění souvisejících s oxidačním stresem v kůži, například rakoviny kůže a psoriázy. Oxidativní stres a jeho procesy jsou rovněž nezbytné pro vývoj fibrózy u fibrotických poruch, jako je sklerodermie, GVHD, hypertrofické jizvy, NSF a jiná kožní patologická onemocnění. Nová generace cytokininových sloučenin pro použití pro léčbu kožních onemocnění vyvolaných zvýšeným oxidativním stresem se vyznačuje zlepšenou selektivitou a indexem účinnosti, tedy zahrnuje látky, které jsou méně toxické a ještě účinnější než až dosud známé analogy.

25

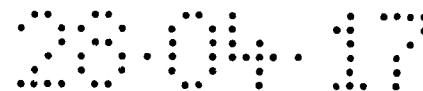
Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminů obecného vzorce **I**,



30

I
ve kterém



- R^2 a R^3 jsou nezávisle vybrány z H, $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0$ nebo 1 nebo 2, $-CH_2(CH_3)_2$, $-(CH_2)_n - N(CH_3)_2$, $n = 2$ nebo 3,

příčemž alespoň jeden ze substituentů R^2 a R^3 je alkyl nebo dimethylaminoalkyl;

5 - o je celé číslo v rozmezí 2 až 5, tedy 2 nebo 3 nebo 4 nebo 5, přičemž vodík v alespoň jedné methylenové skupině (CH_2) v substituentu na N9 může být volitelně nahrazen methylem nebo methoxy skupinou, tedy substituent na N9 je vybrán ze skupiny zahrnující oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl or oxepan-2-yl, volitelně substituované alespoň jedním methylem nebo methoxylem;

- R^1 je vybráno ze skupiny zahrnující

10 - furfuryl nebo furfuryl substituovaný alespoň jednou, s výhodou právě jednou, methylovou nebo methoxy skupinou,

- benzyl nebo benzyl substituovaný alespoň jedním substituentem, s výhodou jedním nebo dvěma nebo třemi substituenty, vybraným ze skupiny zahrnující methyl, trifluormethyl, hydroxy, methoxy, trifluormethoxy, halogen, amino, methoxykarbonyl nebo acetoxy,

15 - 3-methylbut-2-en-1-yl,

- 3-methylbut-3-en-1-yl,

- 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl,

- 4-hydroxy-3-methylbutyl.

a jejich farmaceuticky přijatelné soli.

20

Farmaceuticky přijatelnými solemi jsou zejména soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami. S výhodou se jedná o farmaceuticky nebo kosmeticky akceptovatelné soli.

25 V případě, že jsou v molekule chirální centra, pak tento vynález zahrnuje i opticky aktivní isomery, jejich směsi a racemáty.

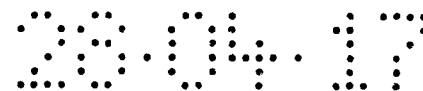
S výhodou, je-li R^2 nebo R^3 $-(CH_2)_n N(CH_3)_2$, je druhý z těchto substituentů vodík.

30 S výhodou je skupina $-N(R^2)(R^3)$ vybrána ze skupiny zahrnující methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino.

S výhodou je skupina $-N(R^2)(R^3)$ vybrána ze skupiny zahrnující methylamino, ethylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino.

35

S výhodou je R^1 vybrán ze skupiny zahrnující furfuryl, 3-methylfurfuryl, 4-methylfurfuryl, 5-methylfurfuryl, 3-methoxyfurfuryl, 4-methoxyfurfuryl, 5-methoxyfurfuryl, benzyl, 2-methylbenzyl,



3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-(trifluormethyl)benzyl, 3-(trifluormethyl)benzyl, 4-(trifluormethyl)benzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzylamino, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 2-(trifluormethoxy)benzyl, 3-(trifluormethoxy)benzyl, 4-(trifluormethoxy)benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-jodbenzyl, 3-jodbenzyl, 4-jodbenzyl, 2-aminobenzyl, 3-aminobenzyl, 4-aminobenzyl, 2-(methoxykarbonyl)benzyl, 3-(methoxykarbonyl)benzyl, 4-(methoxykarbonyl)benzyl, 2-acetoxybenzyl, 3-acetoxybenzyl, 4-acetoxybenzyl, 2,3-dihydroxybenzyl, 2,5-dihydroxybenzyl, 3,4-dihydroxybenzyl, 3,5-dihydroxybenzyl, 2,3-dimethoxybenzyl, 2,5-dimethoxybenzyl, 3,4-dimethoxybenzyl, 3,5-dimethoxybenzyl, 2,6-difluorbenzyl, 3,4-difluorbenzyl, 3,5-difluorbenzyl, 2,3-dichlorbenzyl, 2,4-dichlorbenzyl, 3,4-dichlorbenzyl, 3,5-dichlorbenzyl, 2-hydroxy-3-methylbenzyl, 2-hydroxy-5-methylbenzyl, 2-hydroxy-3-methoxybenzyl, 2-hydroxy-4-methoxybenzyl, 3-hydroxy-4-methoxybenzyl, 4-hydroxy-2-methoxybenzyl, 4-hydroxy-3-methoxybenzyl, 3-fluor-4-hydroxybenzyl, 3-chlor-4-hydroxybenzyl, 4-fluor-3-hydroxybenzyl, 4-chlor-3-hydroxybenzyl, 2-chlor-4-fluorbenzyl, 2-chlor-6-fluorbenzyl, 3,4,5-trihydroxybenzyl, 3,4,5-trimethoxybenzyl, 2,3,4-trifluorbenzyl, 2,3,6-trifluorbenzyl, 3,4,5-trifluorbenzyl, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl, 3-methylbut-2-en-1-yl, 3-methylbut-3-en-1-yl, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl, -hydroxy-3-methylbutyl)amino.

S výhodou je substituent na N9 vybrán z tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylu a tetrahydrofuran-2-ylu, které mohou být volitelně substituované alespoň jednou, s výhodou jednou, methylovou nebo methoxylovou skupinou.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminové deriváty obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující:

2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-furfurylamino-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(3-methylfurfuryl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(4-methylfurfuryl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin, 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-

2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(3-methylbut-3-en-1-yl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-(*E*)-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-(*Z*)-[(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino, ethylamino, propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino)-6-[(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino]-9-(oxetan-2-yl, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl, oxepan-2-yl)-9*H*-purin, a jejich farmaceuticky využitelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, jakož i jejich adičních solí s kyselinami.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminy obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující:

2-(methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin, 2-(ethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(dimethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(diethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-{{2-(dimethylamino)ethyl}amino}-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin, 2-(ethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(dimethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(diethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-{{2-(dimethylamino)ethyl}amino}-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin a jejich soli, ve kterých může být furfurylová skupina volitelně substituovaná alespoň jedním substituentem zvoleným z množiny zahrnující methyl nebo methoxy skupinu.

N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminy podle tohoto vynálezu mají širokou škálu biologických aktivit, mezi něž patří antioxidační, antisenescenční, antiaging a prodiferenční aktivity, což jsou aktivity zejména použitelné ve farmaceutických a kosmetických aplikacích. Látky podle tohoto vynálezu vykazují antioxidační, prodiferenční, antisenescenční a antiaging (protistárnoucí) vlastnosti o zvýšené selektivitě a účinnosti a rovněž o minimální nebo žádné toxicitě v porovnání s analogy známými ze současného stavu techniky.

Předmětem tohoto vynálezu jsou N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminy obecného vzorce I pro použití při ochraně buněk jak *in vivo*, tak *in vitro*, jako antioxidanty pro inhibici nepříznivých metabolických procesů v rostlinách a zvířatech.

5

Předmětem tohoto vynálezu jsou N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminy obecného vzorce I pro použití k aktivaci signální dráhy Nrf2-elementu antioxidantní odpovědi, která kontroluje expresi genů, jejichž proteinové produkty jsou zapojeny v detoxifikaci a eliminaci reaktivních oxidantů a elektrofilních agens cestou konjugativních reakcí a cestou zvýšení buněčné antioxidantní kapacity.

10

Předmětem tohoto vynálezu jsou N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminy obecného vzorce I pro použití jako antioxidanty pro inhibici peroxidace lipidů, nukleových kyselin a proteinů v rostlinách a zvířatech *in vivo* i *in vitro*.

15

Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být použity jako léčiva. Mohou být použity pro léčbu řady onemocnění u savců, zejména člověka. S výhodou zahrnují tato onemocnění choroby kůže. Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být rovněž použity jako antineurodegenerativní léčiva nebo pro potlačení imunostimulace (např. ošetření artritidy nebo potlačení rejekce transplantátů). Sloučeniny podle vynálezu vykazují zejména antioxidantní, protizánětlivé a antisenescentní vlastnosti.

20

Tento vynález také poskytuje látky obecného vzorce I pro použití v prevenci a léčbě onemocnění zahrnujících oxidační stres v kůži, například rakoviny kůže, psoriázy, fibrózy u fibrotických poruch, jako je sklerodermie, reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), hypertrofické jizvy, nefrogenní systémové fibrózy (NSF). Dále je lze použít pro léčbu dalších chorob zahrnujících oxidační stres, např. při léčbě lupenky, alergického ekzému, toxického ekzému, atopické dermatitidy, lichen planus, hyperpigmentace a leze herpes simplex, ichtyózy, papilomu, Bowenovy choroby, seboroické keratózy, aktinické keratózy, bazálního a spinocelulárního karcinomu.

25

Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být rovněž použity v kosmetice. Kosmetické použití těchto sloučenin a jejich solí zahrnuje inhibici, zpomalení, nebo redukci nepříznivých vlivů stárnutí a senescence buněk, zejména epidermálních buněk jakými jsou keratinocyty nebo fibroblasty, *in vivo* a *in vitro*; kosmetické použití zahrnuje rovněž vylepšení celkového vzhledu a vlastností pokožky savce, zejména člověka, včetně změn souvisejících s věkem a dalších změn, např. akné, erytém, zarudnutí kůže.

35

Tento vynález rovněž poskytuje použití sloučenin obecného vzorce I pro inhibici senescence a stárnutí u zvířat a rostlin, přičemž toto použití zahrnuje aplikaci účinného množství N^2, N^6 -disubstituovaného-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminového derivátu *in vivo* nebo *in vitro*.

- 5 Tento vynález dále poskytuje použití N^2, N^6 -disubstituovaného-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminového derivátu při rejuvenizaci pokožkových buněk, stimulaci buněčné proliferace stárnoucích buněk a/nebo jejich diferenciaci v organismu.

10 Jak je zde uvedeno, zlepšení, inhibice a oddálení nepříznivých účinků stárnutí živočišných buněk znamená, že vývoj morfologických změn, které se normálně vyskytují ve spojitosti se stárnutím v normálních savčích buňkách *in vitro* nebo *in vivo*, je zpomalen, obrácen, nebo zpožděn. Nepříznivé účinky stárnutí rovněž zahrnují se stářím spojené změny genové exprese a proteinové biosyntézy. Za zlepšující účinky jsou v tomto vynálezu považovány ty, které se projevují zvýšením a rychlostí buněčného růstu nebo celkovou proliferační kapacitou ošetřených buněk. Zlepšení, odstranění či
15 oddálení nepříznivých vlivů stárnutí na buněčné úrovni je možné detekovat jako zpomalení nebo obrat morfologických a fenotypických změn souvisejících s věkem, které se běžně vyskytují při stárnutí buněk. Změny související s věkem *in vivo* zahrnují změny v savčích tkáních, jakými jsou vývoj, nárůst počtu a hloubky vrásek, čar, pokleslá kůže, odbarvení, tvorba stařeckých skvrn, kožovatení, nebo nažloutlý vzhled, spojené s kosmetických vzhledem kůže i změnami ve strukturální
20 a funkční integritě kožních tkání.

N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminové deriváty podle tohoto vynálezu jsou účinné v zlepšování celkového vzhledu a kondice kůže, a to včetně eliminace změn souvisejících se stářím a dalších nežádoucích změn pokožky (např. akné, erytém, zarudnutí kůže, rosacea).

25 Tento vynález dále poskytuje kosmetické a/nebo farmaceutické kompozice obsahující jeden nebo více N^2, N^6 -disubstituovaných-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminových obecného vzorce I společně s kosmeticky a/nebo farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

30 N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminové deriváty obecného vzorce I mohou být dále použity jako faktory buněčného dělení a diferenciaci savčích a lidských buněk.

FARMACEUTICKÉ A KOSMETICKÉ KOMPOZICE

35 Vhodné cesty pro systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutanní), bukální, sublinguální a nasální. Lokální podání je možné ve formě očních a ušních kapek a mastí, ve formě vaginálních přípravků a rektálních čípků. Pro terapii onemocnění skalpu a kůže

jsou výhodou lékovou formou roztoky, krémy a masti. V případě onemocnění oka může být vhodnou formou podání intravitreální injekce nebo medikovaný inzert. V případě onemocnění plic pak inhalační lékové formy. Vhodnou formou prevence restenosis po cévní nebo srdeční chirurgii je medikovaný stent. V případě onemocnění gastrointestinálního traktu je výhodné perorální nebo

5

rektální podání. Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta a místě onemocnění, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují

10

přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např.

15

běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy. Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např.

20

konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulose, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu. Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje

25

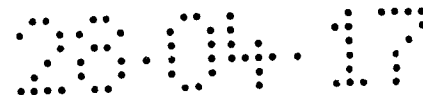
obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8-22, s výhodou pak 12-22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou,

30

případně s přísadkou antioxidantů, např. vitamínu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydrická, např. mono-, di- nebo trihydrické alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“

35

(polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholovou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy



připravené alkoholózou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sesamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejně.

- 5 Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

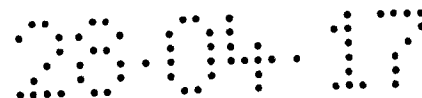
Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přidavkem dalších neutrálních látek.

- 10 Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktosa, sacharosa, mannitol nebo sorbitol, celulosové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosa a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a
- 15 dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearat hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

- Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči
- 20 žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulosových preparátů jako acetylcelulosaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulosaftalát. Barviva nebo pigmenty
- 25 jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

- Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy
- 30 nebo lubrikanty jako talek nebo stearat hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafínový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

- 35 Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo



10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulose, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafinový olej nebo tvrdé parafíny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a/nebo polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelínu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo staryl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v

přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

5 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné
10 uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovadla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky
15 rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou
20 kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných
25 živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Popis obrázků

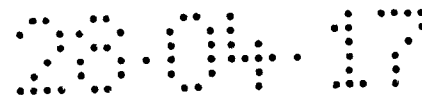
30

Obrázek 1 znázorňuje inhibici produkce intracelulární ROS sloučeninou 114. Úsečky naznačují průměr ± SD. Rozdíly mezi kontrolou a buňkami ošetřenými sloučeninou **114** byly testovány Studentovým t-test (** p<0.01, *** p<0.001).

Příklady provedení vynálezu

35

Vynález je popsán pomocí následujících příkladů, které ovšem nijak neomezují jeho rozsah.



Pokud není uvedeno jinak, veškerá procenta jsou uváděna jako hmotnostní. Výchozí látky je možné získat z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.) nebo mohou být připraveny, jak je popsáno níže. Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na hliníkových destičkách s oxidem křemičitým Silica 60 F₂₅₄ (Merck), kdy jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/methanol. Detekce skvrn byla provedena pomocí UV záření (254 a 365 nm), případně pomocí 6% (v/v) roztoku vanilinu v absolutním ethanolu obsahujícím 1 % (v/v) H₂SO₄. Chromatografické čištění meziproduktů a finálních produktů bylo prováděno na koloně s oxidem křemičitým Davisil 40-63 micron (Grace Davision). Elementární analýza byla stanovena na analyzátoru Flash EA 1112 (Thermo Scientific). Chromatografická čistota a molekulová hmotnost připravených látek byla stanovena pomocí kapalinového chromatografu Alliance 2695 Separation Module (Water) připojenému k DAD detektoru PDA 996 (Waters) a kvadrupól-time of flight tandemovému hmotnostnímu spektrometru Q-Tof micro (Waters). Látky byly rozpuštěny v DMSO a zředěny na koncentraci 10 µg/ml v počáteční mobilní fázi (90 % 15mM mravenčan amonný, pH = 4,0 (A) + 10 % methanol (B)). Vzorky (10 µl) byly aplikovány na kolonu s reverzní fází Symmetry C18 (150 mm × 2,1 mm × 3,5 µm, Waters) a separovány při průtoku 0,2 ml/min s následujícím binárním gradientem: 0 min, 10 % B; 0-24 min, lineární gradient na 90% B, 10 min, isokratická eluce 90% B. Na konci gradientu byla kolona znovu ekvilibrována na počáteční podmínky. Eluát byl zaváděn do DAD (rozsah skenování 210-400 nm, rozlišení 1,2 nm) a do iontové zdroje ESI (teplota zdroje 110 °C, kapilární napětí +3,0 kV, napětí na vstupní štěrbině +20 V, teplota desolvatace 250 °C). Jako desolvatační plyn (500 l/h) a zmlžovací plyn (50 l/h) byl použit dusík. Data byla získána v kladném ionizačním módu (ESI+) v rozsahu 50-1000 *m/z*. ¹H a ¹³C NMR spektra by změřena na NMR spektrometru Jeol ECA-500 pracujícím při frekvenci 500 MHz (¹H) a 126 mHz (¹³C) nebo spektrometru Bruker Avance pracujícím při frekvenci 300 MHz (¹H) a 75 MHz (¹³C). Vzorky byly připraveny rozpuštěním látek v DMSO-*d*₆ a chemické posuny byly kalibrovány na residuální pík rozpouštědla (DMSO, 2,49 ppm pro proton) a DMSO-*d*₆ (39,5 ppm pro uhlík).

*N*²,*N*⁶-disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminu byly připraveny třístupňovou syntézou z 2,6-dichlor-9*H*-purinu. 2-Oxacykloalkylové substituenty byly zavedeny do pozice *N*₉ na purinovém kruhu hydroaminací odpovídajících α,β-nenasycených *O*-heterocyklů 2,6-dichlor-9*H*-purinem v ethyl-acetátu za katalýzy kyselinou trifluoroctovou podle protokolu (Szüčová et al. 2009 *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1938-1947). 2,3,4,5-Tetrahydrooxepin byl připraven *endo* cykloizomerací 5-hexyn-1-olu, katalyzovanou smíšeným (N/P) tetradentátním rutheniovým komplexem (Liu et al. 2010 *Chem. Eur. J.* 16, 7889-7897 a Mitchell et al. 1973 *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (8), 846-854).

Tyto intermediáty byly dále podrobeny nukleofilní substituci v poloze C6 odpovídajícími aminy v refluxujícím propanolu za přítomnosti triethylaminu a následné nukleofilní substituci v poloze C2. Aminy o malé molekulové hmotnosti, jako například methylamin nebo dimethylamin, byly zavedeny

do polohy C2 za použití modifikovaného postupu publikovaného v Kelley et al. 1989 *J. Med. Chem.* **32**, 218-224, zatímco aminy o větší molekulové hmotnosti podle Kurimoto et al. 2003 *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 5501-5508.

5 Modifikace purinů na pozici N9:

A) Hydroaminace α,β -nenasycených O-heterocyklů

Příklad 1 2,6-Dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin K suspenzi 2,6-dichlor-9H-purinu (1 ekviv, 5 g) a 2,3-dihydrofuranu (2,5 ekviv.) v suchém ethyl-acetátu (40 ml) byla pod Ar atmosférou
10 přikapána trifluoroctová kyselina (2,5 ekviv.) a výsledná směs byla míchána 2 hodiny za laboratorní teploty. Po vychlazení v ledové lázni bylo pH roztoku upraveno pomocí směsi konc. vodný amoniak/voda (2:3, v/v) na pH 7-8. Vrstvy byly odděleny a vodná fáze byla extrahována ethyl-acetátem (5× 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (2× 25 ml), vysušeny (Na_2SO_4) a zakoncentrovány za sníženého tlaku. Pevný světle žlutý produkt byl získán po rekrystalizaci z
15 petroletheru. Pevná světle žlutá látka, sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek (%): 98. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 21,07; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 258,8 (8, [³⁵Cl-M+H]⁺); 260,8 (6, [³⁷Cl-M+H]⁺); 188,8 (100, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 190,8 (68, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,01-2,08 (m, 1H); 2,11-2,20 (m, 1H); 2,41-2,46 (m, 2H); 3,93 (q, *J* = 7,5 Hz, 1H); 4,18 (td, *J* = 7,9, 5,7 Hz, 1H); 6,33 (dd, *J* = 5,8, 4,3 Hz, 1H); 8,82 (s, 1H). ¹³C NMR (126
20 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,8; 31,3; 69,2; 85,6; 131,0; 146,4; 149,6; 150,9; 152,6.

Příklad 2 2,6-Dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin K suspenzi 2,6-dichlor-9H-purinu (1 ekviv., 5 g) a 3,4-dihydro-2H-pyranu (2 ekviv.) v suchém ethyl-acetátu (50 ml) byla pod Ar atmosférou přikapána trifluoroctová kyselina (1,8 ekviv.) a výsledná směs byla míchána 2 hodiny za
25 laboratorní teploty. Po vychlazení v ledové lázni bylo pH roztoku upraveno pomocí směsi konc. vodný amoniak/voda (2:3, v/v) na pH 7-8. Vzniklá pevná látka byla zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena za laboratorní teploty. Druhý podíl produktu byl extrakcí filtrátu a proplachů ethyl-acetátem (3× 25 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (2× 15 ml), vysušeny (Na_2SO_4) a zakoncentrovány za sníženého tlaku na žlutý gel. Pevný produkt byl získán rekrystalizací z
30 diethyletheru. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$, výtěžek (%): 88. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 22,87; 98,4. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 273,0 (10, [³⁵Cl-M+H]⁺); 275,0 (8, [³⁷Cl-M+H]⁺); 189,0 (100, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 191,0 (74, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,56-1,61 (m, 2H); 1,73-1,77 (m, 1H); 1,94-2,01 (m, 2H); 2,21-2,29 (m, 1H); 3,70-3,75 (m, 1H); 4,00-4,03 (m, 1H); 5,73 (dd, *J* = 10,9, 2,3 Hz, 1H); 8,95 (s, 1H). ¹³C
35 NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,0; 24,3; 29,6; 67,7; 81,6; 130,5; 146,4; 149,9; 151,2; 152,7.

Substituce purinů v pozici C6:

Syntéza 2-chlor-6-substituovaných-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purinových derivátů – typický postup

Směs 2,6-dichlor-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purinu (1 ekviv., 250 mg), aminu postranního řetězce (1,2 ekviv.) a triethylaminu (2,5 ekviv. a v případě solí 3,5 ekviv.) byla refluxována 4 hodiny v propanolu (9 ml). Po odpaření za sníženého tlaku byla k odparku přidána ledová voda (15 ml).

Metoda A) V případě získání pevné látky – pevná látka byla zfiltrována, pečlivě promyta vychlazenou vodou a vysušena.

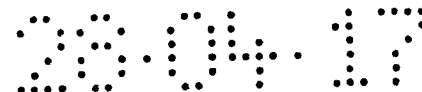
Metoda B) V případě, že se neobjevila pevná látka – směs byla extrahována ethyl-acetátem (5 × 10 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou (2 × 10 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a zakoncentrovány za sníženého tlaku.

Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s využitím mobilní směsi chloroform/methanol, začínající čistým chloroformem s následným gradientem methanolu.

Příklad 3 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a furfurylaminu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₄H₁₄ClN₅O₂, výtěžek (%): 85. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,43; 99,8. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 319,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 321,8 (45, [³⁷Cl-M+H]⁺); 249,8 (83, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 251,8 (35, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,96-2,04 (m, 1H); 2,11-2,20 (m, 1H); 2,36-2,41 (m, 2H); 3,89 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H); 4,11 (td, *J* = 7,8, 5,9 Hz, 1H); 4,61 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 6,19 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H); 6,25 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 6,37 (bs, 1H); 7,54-7,55 (m, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,76 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,1; 31,2; 36,6; 68,7; 84,4; 107,1; 110,5; 118,6; 139,7; 142,0; 149,3; 152,0; 152,9; 154,7.

Příklad 4 2-Chlor-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5-methylfurfurylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₆ClN₅O₂, výtěžek (%): 66. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,05; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 334,6 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 336,7 (64, [³⁷Cl-M+H]⁺); 264,5 (87, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 266,6 (43, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,96-2,04 (m, 1H); 2,13-2,17 (m, 1H); 2,20 (s, 3H); 2,36-2,41 (m, 2H); 3,89 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H); 4,11 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,55 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 5,96 (bs, 1H); 6,11 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 6,19 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,72 (bs, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13,3; 24,1; 31,2; 36,6; 68,7; 84,4; 106,4; 107,9; 118,6; 139,6; 149,3; 150,1; 150,5; 152,9; 154,6.

Příklad 5 2-Chlor-6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a benzylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární

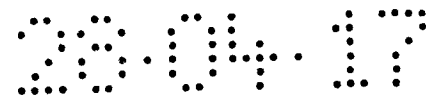


vzorec: $C_{16}H_{16}ClN_5O$, výtěžek (%): 65. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,39; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 330,7 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 332,7 (63, [³⁷Cl-M+H]⁺); 260,5 (82, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 262,6 (40, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,99-2,04 (m, 1H); 2,13-2,18 (m, 1H); 2,38-2,39 (m, 2H); 3,88-3,90 (m, 1H); 4,10-4,11 (m, 1H); 4,63 (bs, 2H); 6,18-6,19 (m, 1H); 7,22 (bs, 1H); 7,31 (bs, 4H); 8,28 (s, 1H); 8,86 (bs, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,1; 31,2; 43,1; 68,7; 84,4; 118,5; 126,8; 2× 127,2; 2× 128,2; 139,2; 139,6; 149,2; 153,0; 154,9.

Příklad 6 2-Chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 3-(aminomethyl)fenolu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{16}H_{16}ClN_5O_2$, výtěžek (%): 94. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,33; 99,2. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 345,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 347,8 (40, [³⁷Cl-M+H]⁺); 275,8 (83, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 277,8 (35, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,98-2,03 (m, 1H); 2,14-2,19 (m, 1H); 2,39 (dd, $J = 12,8, 7,3$ Hz, 2H); 3,89 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,11 (dd, $J = 13,8, 7,6$ Hz, 1H); 4,56 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H); 6,19 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 6,60 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H); 6,70 (s, 1H); 6,73 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,08 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,81 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H); 9,31 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,1; 31,2; 42,9; 68,7; 84,4; 113,7; 113,8; 117,7; 118,5; 129,2; 139,5; 140,7; 149,2; 153,1; 154,9; 157,3.

Příklad 7 2-Chlor-6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 4-(aminomethyl)fenolu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{16}H_{16}ClN_5O_2$, výtěžek (%): 98. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,02; 97,6. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 345,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 347,8 (45, [³⁷Cl-M+H]⁺); 275,8 (85, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 277,8 (35, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,96-2,04 (m, 1H); 2,12-2,20 (m, 1H); 2,36-2,41 (m, 2H); 3,89 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,11 (td, $J = 7,7, 6,2$ Hz, 1H); 4,51 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H); 6,18 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 6,68 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,14 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 8,25 (s, 1H); 8,69 (příbl. t, 1H); 9,23 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,0; 31,1; 42,6; 68,6; 84,3; 2× 114,9; 118,5; 2× 128,6; 129,3; 139,3; 149,1; 153,0; 154,7; 156,2.

Příklad 8 2-Chlor-6-[(2-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu and 2-methoxybenzylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{17}H_{18}ClN_5O_2$, výtěžek (%): 53. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,97; 98,7. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 360,3 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 362,3 (65, [³⁷Cl-M+H]⁺); 290,6 (88, [³⁵Cl-M-THF+H]⁺); 292,6 (46, [³⁷Cl-M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,99-2,03 (m, 1H); 2,14-2,18 (m, 1H); 2,38-2,42 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 3,89 (q, $J = 7,3$



Hz, 1H); 4,09-4,14 (m, 1H); 4,61 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H); 6,19 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H); 6,85 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,98 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,10 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,21 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,63 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,1; 31,2; 38,4; 55,3; 68,7; 84,4; 110,4; 118,6; 120,1; 126,4; 126,8; 127,9; 139,5; 149,2; 153,1; 155,1; 156,5.

5

Příklad 9 2-Chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 4-methoxybenzylaminu, zpracování metodou B. Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek (%): 54. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,17; 98,3. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 360,3 (100, [$^{35}\text{Cl-M+H}$]⁺); 362,3 (68, [$^{37}\text{Cl-M+H}$]⁺); 290,6 (87, [$^{35}\text{Cl-M-THF+H}$]⁺); 292,6 (48, [$^{37}\text{Cl-M-THF+H}$]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,97-2,02 (m, 1H); 2,13-2,18 (m, 1H); 2,36-2,40 (m, 2H); 3,70 (s, 3H); 3,88 (q, $J = 7,4$ Hz, 1H); 4,08-4,12 (m, 1H); 4,55 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H); 6,18 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 6,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,26 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 8,27 (s, 1H); 8,79 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,1; 31,2; 42,5; 55,0; 68,7; 84,4; 2 \times 113,6; 118,5; 128,4; 128,7; 131,1; 139,5; 149,1; 153,0; 154,7; 158,2.

10

15

Příklad 10 2-Chlor-6-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 4-(aminomethyl)-2-methoxyfenolu hydrochloridu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_3$, výtěžek (%): 96. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,27; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 375,8 (99, [$^{35}\text{Cl-M+H}$]⁺); 377,8 (43, [$^{37}\text{Cl-M+H}$]⁺); 305,8 (100, [$^{35}\text{Cl-M-THF+H}$]⁺); 307,8 (42, [$^{37}\text{Cl-M-THF+H}$]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,96-2,04 (m, 1H); 2,12-2,20 (m, 1H); 2,36-2,41 (m, 2H); 3,73 (s, 3H); 3,89 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,11 (td, $J = 7,7, 6,2$ Hz, 1H); 4,51 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H); 6,18 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H); 6,68 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,73 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,00 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,68 (příbl. t, 1H); 8,79 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,0; 31,1; 43,0; 55,4; 68,6; 84,3; 112,3; 115,1; 118,5; 120,0; 129,9; 139,3; 145,4; 147,2; 149,1; 153,0; 154,7.

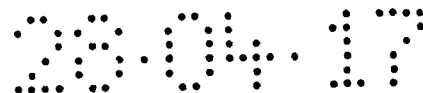
20

25

Příklad 11 2-Chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a furfurylaminu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_5\text{O}_2$, výtěžek (%): 83. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 25,57; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 334,0 (100, [$^{35}\text{Cl-M+H}$]⁺); 336,0 (56, [$^{37}\text{Cl-M+H}$]⁺); 249,9 (92, [$^{35}\text{Cl-M-THP+H}$]⁺); 251,9 (44, [$^{37}\text{Cl-M-THP+H}$]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H); 1,68-1,74 (m, 1H); 1,91-1,95 (m, 2H); 2,15-2,23 (m, 1H); 3,65-3,70 (m, 1H); 3,97-3,99 (m, 1H); 4,62 (d, $J = 4,0$ Hz, 2H); 5,55-5,57 (m, 1H); 6,26 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,37 (bs, 1H); 7,55 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H); 8,39 (s, 1H); 8,78 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ

30

35

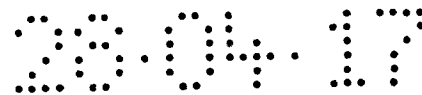


(ppm): 22,2; 24,4; 29,9; 36,6; 67,6; 80,8; 107,0; 110,4; 118,1; 139,5; 141,9; 149,4; 151,9; 153,1; 154,6.

Příklad 12 *2-chlor-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5-methylfurfurylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₅O₂, výtěžek (%): 96. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,98; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 348,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 350,8 (64, [³⁷Cl-M+H]⁺); 264,7 (91, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 266,7 (47, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,91-1,95 (m, 2H); 2,13-2,20 (m, 4H); 3,65-3,70 (m, 1H); 3,98 (dd, *J* = 10,9, 1,7 Hz, 1H); 4,55 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 5,55-5,57 (m, 1H); 5,96 (bs, 1H); 6,11 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H); 8,38 (s, 1H); 8,73 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13,2; 22,3; 24,4; 29,9; 36,7; 67,6; 80,8; 106,4; 107,9; 118,1; 139,5; 149,4; 150,1; 150,5; 153,1; 154,6.

Příklad 13 *2-Chlor-6-benzylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a benzylaminu, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O, výtěžek (%): 97. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27,28; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 344,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 346,8 (64, [³⁷Cl-M+H]⁺), 260,6 (90, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 262,6 (47, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,60 (m, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,93 (bs, 2H); 2,16-2,24 (m, 1H); 3,65-3,70 (m, 1H); 3,98 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H); 4,64 (d, *J* = 3,7 Hz, 2H); 5,55 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 7,22 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H); 7,28-7,33 (m, 4H); 8,38 (s, 1H); 8,88 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,4; 29,9; 43,1; 67,6; 80,8; 118,0; 126,8; 2 × 127,2; 2 × 128,2; 139,2; 139,4; 149,3; 153,2; 154,9.

Příklad 14 *2-Chlor-6-[(4-methylbenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Přípraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 4-methylbenzylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₀ClN₅O, výtěžek (%): 99. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,63; 98,5. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 358,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 360,8 (72, [³⁷Cl-M+H]⁺); 274,6 (90, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 276,6 (59, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,90-1,94 (m, 2H); 2,15-2,27 (m, 4H); 3,64-3,70 (m, 1H); 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H); 4,58 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H); 5,55 (dd, *J* = 10,9, 2,0 Hz, 1H); 7,10 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,20 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 8,37 (s, 1H); 8,84 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20,6; 22,3; 24,5; 29,9; 42,8; 67,6; 80,8; 118,0; 2 × 127,2; 2 × 128,8; 135,8; 136,1; 139,4; 149,3; 153,3; 154,9.



Příklad 15 2-Chlor-6-{[4-(trifluormethyl)benzyl]amino}-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 4-(trifluormethyl)benzylamine, zpracování metodou A. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₈H₁₇ClF₃N₅O, výtěžek (%): 73. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 29,12; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 412,7 (97, [³⁵Cl-M+H]⁺); 414,7 (65, [³⁷Cl-M+H]⁺); 328,7 (90, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 330,7 (64, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,55 (bs, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,93 (bs, 2H); 2,16-2,24 (m, 1H); 3,65-3,70 (m, 1H); 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H); 4,72 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H); 5,55-5,57 (m, 1H); 7,53 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,68 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 8,41 (s, 1H); 8,98 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,4; 29,9; 42,8; 67,6; 80,9; 118,1; 124,3 (q, ¹*J*_{CF} = 272,3Hz); 2× 125,2 (q, ³*J*_{CF} = 2,4 Hz); 127,5 (q, ²*J*_{CF} = 32,2 Hz); 2× 127,8; 139,7; 144,1; 149,4; 153,2; 154,9.

Příklad 16 2-Chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin Připraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 3-(aminomethyl)fenolu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O₂, výtěžek (%): 73.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,43; 99,8. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 359,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 361,8 (40, [³⁷Cl-M+H]⁺); 275,8 (99, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 277,8 (38, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,58 (m, 2H); 1,70-1,74 (m, 1H); 1,90-1,95 (m, 2H); 2,16-2,21 (m, 1H); 3,65-3,70 (m, 1H); 3,96-3,99 (m, 1H); 4,56 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H); 5,56 (dd, *J* = 11,0, 2,1 Hz, 1H); 6,60 (dd, *J* = 7,9, 1,8 Hz, 1H); 6,70 (s, 1H); 6,73 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,08 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 8,38 (s, 1H); 8,83 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H); 9,31 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,5; 29,9; 42,9; 67,7; 80,9; 113,7; 113,8; 117,7; 118,0; 129,2; 139,4; 140,6; 149,3; 153,3; 154,9; 157,3.

Příklad 17 2-Chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin Připraven z

2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 4-(aminomethyl)fenolu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅O₂, výtěžek (%): 99. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,98; 98,0. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 360,8 (90, [³⁵Cl-M+H]⁺); 362,8 (51, [³⁷Cl-M+H]⁺); 276,7 (100, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 278,6 (58, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,57 (m, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,90-1,94 (m, 2H); 2,15-2,23 (m, 1H); 3,64-3,70 (m, 1H); 3,98 (d, *J* = 11,3 Hz, 1H); 4,51 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H); 5,55 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H); 6,68 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,13 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H); 8,36 (s, 1H); 8,76 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H); 9,27 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,4; 29,9; 42,6; 67,6; 80,8; 2× 115,0; 118,0; 128,5; 128,7; 129,3; 139,3; 149,2; 153,3; 154,8; 156,3.

Příklad 18 2-Chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2,6-dichlor-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purinu a 4-methoxybenzylaminu, zpracování metodou B. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₀ClN₅O₂, výtěžek (%): 99. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27,10; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 374,8 (98, [³⁵Cl-M+H]⁺); 376,8 (65, [³⁷Cl-M+H]⁺); 290,7 (100, [³⁵Cl-M-THP+H]⁺); 292,7 (62, [³⁷Cl-M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,53-1,60 (m, 2H); 1,67-1,76 (m, 1H); 1,90-1,95 (m, 2H); 2,15-2,23 (m, 1H); 3,64-3,67 (m, 1H); 3,70 (s, 3H); 3,98 (dd, *J* = 10,9, 1,7 Hz, 1H); 4,55 (d, *J* = 4,6 Hz, 2H); 5,55 (dd, *J* = 10,9, 1,7 Hz, 1H); 6,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,26 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H); 8,37 (s, 1H); 8,82 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,3; 24,4; 29,9; 42,6; 55,0; 67,6; 80,8; 2× 113,6; 118,0; 128,4; 128,7; 131,1; 139,4; 149,2; 153,2; 154,8; 158,2.

10

Substituce purinů v pozici C2:

A) Substituce primárními a sekundárními alkyly aminy – typický postup

Směs 2-chlor-6-substituovaného-9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purinu (150 mg, 1 ekviv.) a aminu (20 ekviv.) byla zahřívána v tlakové ampuli pod Ar atmosférou 16 hodin na 95 °C. Po zakoncentrování za sníženého tlaku byl odparek rozsuspendován v ledové vodě (5 ml). Výsledná pevná látka byla zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena za laboratorní teploty. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s využitím mobilní směsi chloroform/methanol, začínající čistým chloroformem s následným gradientem methanolu.

20

Příklad 19 2-(Methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin Připraven z 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₅H₁₈N₆O₂, výtěžek (%): 74. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 22,03; 99,8. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 315,0 (100, [M+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,93-2,01 (m, 1H); 2,18-2,26 (m, 1H); 2,29-2,36 (m, 1H); 2,41 (bs, 1H); 2,76 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H); 3,85 (q, *J* = 7,5 Hz, 1H); 4,10 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H); 4,60 (bs, 2H); 6,07 (dd, *J* = 6,7, 3,7 Hz, 1H); 6,22 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 6,34 (m, 2H); 7,51 (s, 1H); 7,67 (bs, 1H); 7,81 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,5; 28,1; 30,7; 36,6; 68,3; 83,6; 106,5; 110,3; 113,5; 135,5; 141,5; 150,8; 153,4; 154,2; 159,7.

30

Příklad 20 2-(Dimethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin Připraven z 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₆H₂₀N₆O₂, výtěžek (%): 97. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27,07; 99,3. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 328,8 (100, [M+H]⁺); 258,8 (79, [M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,94-2,01 (m, 1H); 2,21-2,27 (m, 1H); 2,30-2,37 (m, 1H); 2,43-2,48 (m, 1H); 3,06 (s, 6H); 3,84-3,88 (m, 1H); 4,10 (q, *J* = 7,3 Hz, 1H);

35

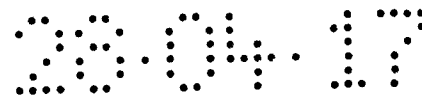
4,59 (bs, 2H); 6,09 (dd, $J = 7,3, 4,0$ Hz, 1H); 6,21 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,34 (dd, $J = 3,1, 1,8$ Hz, 1H); 7,51 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H); 7,79 (bs, 1H); 7,83 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,7; 30,5; 36,3; $2 \times 36,9$; 68,5; 83,8; 106,5; 110,4; 113,1; 136,2; 141,6; 150,8; 153,5; 153,7; 159,0.

5 **Příklad 21** *2-(Dimethylamino)-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin*
 Přípraven z 2-chlor-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%): 66. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,55; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 343,7 (100, [M+H]⁺); 273,6 (70, [M-THP+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,94-2,00 (m, 1H); 2,19 (s, 3H); 2,22-2,27 (m, 1H); 2,30-2,37 (m, 1H); 2,43-2,47 (m, 1H); 3,07 (s, 6H); 3,86 (dd, $J = 13,4, 7,6$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,52 (bs, 2H); 5,93 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,07-6,10 (m, 2H); 7,71 (bs, 1H); 7,82 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13,3; 24,7; 30,5; 36,3; $2 \times 36,9$; 68,5; 83,8; 106,3; 107,3; 113,1; 136,2; 150,0; 150,7; 151,6; 153,6; 159,0.

15 **Příklad 22** *2-(Methylamino)-6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin* Přípraven z 2-chlor-6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}$, výtěžek (%): 58. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,14; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 325,7 (100, [M+H]⁺); 255,6 (38, [M-THF+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,93-2,01 (m, 1H); 2,19-2,26 (m, 1H); 2,30-2,36 (m, 1H); 2,42 (bs, 1H); 2,73 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H); 3,85 (dd, $J = 13,9, 7,5$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,61 (bs, 2H); 6,07 (dd, $J = 6,6, 3,8$ Hz, 1H); 6,31 (bs, 1H); 7,18 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 7,27 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H); 7,80 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,6; 28,2; 30,7; 42,6; 68,4; 83,6; 113,5; 126,4; $2 \times 127,3$; $2 \times 128,0$; 135,5; 140,7; 150,6; 154,4; 159,8.

25 **Příklad 23:** *2-(Dimethylamino)-6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin* Přípraven z 2-chlor-6-benzylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}$, výtěžek (%): 74. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,60; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 339,7 (100, [M+H]⁺); 269,6 (73, [M-THF+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,94-1,99 (m, 1H); 2,21-2,26 (m, 1H); 2,29-2,36 (m, 1H); 2,43-2,48 (m, 1H); 3,03 (s, 6H); 3,84-3,88 (m, 1H); 4,10 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,59 (bs, 2H); 6,08 (dd, $J = 7,3, 4,0$ Hz, 1H); 7,18 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,26 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H); 7,35 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H); 7,82 (s, 1H); 7,97 (bs, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,7; 30,5; $2 \times 36,9$; 43,0; 68,5; 83,8; 113,1; 126,4; $2 \times 127,4$; $2 \times 128,0$; 136,1; 140,8; 150,6; 153,9; 159,0.

35 **Příklad 24** *2-(Dimethylamino)-6-(3-hydroxybenzylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin*
 Přípraveno z 2-chlor-6-(3-hydroxybenzylamino)-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku



dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{18}H_{22}N_6O_2$, výtěžek (%): 53. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 25,73; 98,0. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 354,8 (100, [M+H]⁺); 284,8 (53, [M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,94-1,99 (m, 1H); 2,21-2,27 (m, 1H); 2,30-2,37 (m, 1H); 2,43-2,47 (m, 1H); 3,03 (s, 6H); 3,86 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,52 (bs, 2H); 6,09 (dd, $J = 7,0, 4,0$ Hz, 1H); 6,56 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,75 (s, 1H); 6,76 (s, 1H); 7,05 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,82 (s, 1H); 7,89 (bs, 1H); 9,24 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,8; 30,5; 2× 36,9; 42,9; 68,5; 83,8; 113,1; 113,4; 114,1; 118,0; 129,0; 136,1; 142,2; 150,6; 153,9; 157,2; 159,0.

10 **Příklad 25** *2-(Dimethylamino)-6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin*
 Přípraven z 2-chlor-6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{18}H_{22}N_6O_2$, výtěžek (%): 77. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 25,50; 99,07.

ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 354,8 (100, [M+H]⁺); 284,8 (54, [M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,94-2,00 (m, 1H); 2,21-2,26 (m, 1H); 2,29-2,37 (m, 1H); 2,44-2,48 (m, 1H); 3,06 (s, 6H); 3,86 (td, $J = 7,6, 5,8$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,49 (bs, 2H); 6,08 (dd, $J = 7,2, 3,8$ Hz, 1H); 6,65 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,73 (bs, 1H); 7,79 (s, 1H); 9,16 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,6; 30,5; 2× 36,9; 42,4; 68,4; 83,7; 113,0; 2× 114,7; 2× 128,6; 130,9; 135,9; 150,5; 153,8; 155,9; 159,0.

20

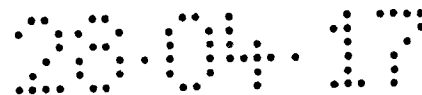
Příklad 26 *2-(Methylamino)-6-[(2-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin*
 Přípraven z 2-chlor-6-[(2-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{18}H_{22}N_6O_2$, výtěžek (%): 77.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,62; 99,0. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 355,8 (100, [M+H]⁺); 285,8 (20, [M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,95-2,00 (m, 1H); 2,22-2,26 (m, 1H); 2,31-2,37 (m, 1H); 2,44 (bs, 1H); 2,70 (d, $J = 4,3$ Hz, 3H); 3,81 (s, 3H); 3,84-3,88 (m, 1H); 4,11 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H); 4,59 (bs, 2H); 6,08 (dd, $J = 6,9, 3,8$ Hz, 1H); 6,29 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H); 6,83 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,95 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 7,13 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H); 7,16-7,19 (m, 1H); 7,49 (bs, 1H); 7,81 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,6; 28,1; 30,7; 37,8; 55,2; 68,4; 83,6; 110,1; 113,6; 119,9; 126,9; 127,5; 127,8; 135,5; 150,5; 154,7; 156,5; 159,8.

30

Příklad 27 *2-(Dimethylamino)-6-[(2-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin*
 Přípraven z 2-chlor-6-[(2-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{19}H_{24}N_6O_2$, výtěžek (%):

35 80. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,95; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 369,8 (100, [M+H]⁺); 299,8 (63, [M-THF+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,94-2,01 (m,



1H); 2,21-2,28 (m, 1H); 2,30-2,37 (m, 1H); 2,44-2,47 (m, 1H); 3,00 (s, 6H); 3,81 (s, 3H); 3,84-3,88 (m, 1H); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,61 (bs, 2H); 6,09 (dd, $J = 7,3, 4,0$ Hz, 1H); 6,83 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H); 6,95 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,16-7,19 (m, 2H); 7,60 (bs, 1H); 7,82 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,7; 30,5; $2 \times 36,8$; 37,7; 55,2; 68,5; 83,8; 110,2; 113,1; 119,9; $2 \times 127,5$; 127,9; 136,1; 150,6; 154,1; 156,5; 159,0.

Příklad 28 2-(methylamino)-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%): 73.

10 HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,85; 98,4. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 355,8 (100, [M+H]⁺); 285,8 (20, [M-THF+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,93-2,01 (m, 1H); 2,18-2,25 (m, 1H); 2,29-2,36 (m, 1H); 2,41 (bs, 1H); 2,75 (d, $J = 4,6$ Hz, 3H); 3,69 (s, 3H); 3,83-3,87 (m, 1H); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,52 (bs, 2H); 6,06 (dd, $J = 7,0, 4,0$ Hz, 1H); 6,30 (bs, 1H); 6,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,27 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,74 (bs, 1H); 7,79 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,6; 28,2; 30,7; 42,0; 54,9; 68,4; 83,6; $3 \times 113,4$; $2 \times 128,7$; 132,6; 135,4; 150,6; 154,3; 157,9; 159,8.

Příklad 29 2-(Dimethylamino)-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin

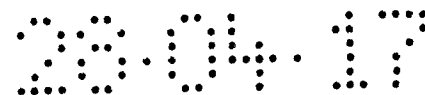
Připraven z 2-chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%):

20 81. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,33; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 369,8 (100, [M+H]⁺); 299,8 (74, [M-THF+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,94-1,99 (m, 1H); 2,20-2,26 (m, 1H); 2,29-2,36 (m, 1H); 2,43-2,47 (m, 1H); 3,05 (s, 6H); 3,68 (s, 3H); 3,85 (td, $J = 7,6, 5,8$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,52 (bs, 2H); 6,08 (dd, $J = 7,2, 3,8$ Hz, 1H); 6,83 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 7,28 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,81 (s, 1H); 7,87 (bs, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,7; 30,5; $2 \times 36,9$; 42,4; 55,1; 68,5; 83,8; 113,1; $2 \times 113,4$; $2 \times 128,7$; 132,7; 136,0; 150,5; 153,8; 157,9; 159,0.

Příklad 30 2-(Dimethylamino)-6-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec:

30 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$, výtěžek (%): 68. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 25,52; 99,7. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 384,8 (100, [M+H]⁺); 314,8 (46, [M-THF+H]⁺). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,94-2,01 (m, 1H); 2,19-2,27 (m, 1H); 2,30-2,37 (m, 1H); 2,44-2,47 (m, 1H); 3,07 (s, 6H); 3,71 (s, 3H); 3,86 (td, $J = 7,7, 5,7$ Hz, 1H); 4,10 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H); 4,50 (bs, 2H); 6,08 (dd, $J = 7,0, 4,0$ Hz, 1H); 6,66 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,76 (dd, $J = 7,9, 1,8$ Hz, 1H); 6,99 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 7,73

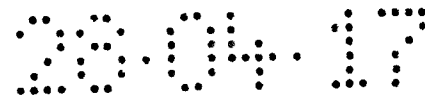


(bs, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,71 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24,7; 30,5; 2 \times 36,9; 42,8; 55,4; 68,4; 83,7; 112,2; 113,0; 115,0; 120,0; 131,5; 135,9; 145,1; 147,1; 150,5; 153,8; 159,0.

Příklad 31 *2-(Methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Připraven z 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%): 52. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 23,42; 99,9. ESI $^+$ -MS m/z (rel. int. %, ion): 328,9 (100, [M+H] $^+$); 244,9 (28, [M-THP+H] $^+$). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,52-1,60 (m, 2H); 1,63-1,72 (m, 1H); 1,84-1,87 (m, 1H); 1,92-1,94 (m, 1H); 2,12-2,20 (m, 1H); 2,78 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H); 3,57-3,62 (m, 1H); 3,96-3,99 (m, 1H); 4,63 (bs, 2H); 5,43 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H); 6,22 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H); 6,34 (m, 2H); 7,51 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H); 7,62 (bs, 1H); 7,87 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,5; 24,5; 28,2; 30,1; 36,3; 67,5; 80,2; 106,5; 110,3; 112,9; 134,9; 141,5; 150,9; 153,4; 154,2; 159,8.

Příklad 32 *2-(Dimethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Připraven z 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%): 96. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,07; 99,9. ESI $^+$ -MS m/z (rel. int. %, ion): 343,0 (100, [M+H] $^+$); 258,9 (88, [M-THP+H] $^+$). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,52-1,56 (m, 2H); 1,66-1,70 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,19 (ddd, $J = 23,9, 12,6, 4,1$ Hz, 1H); 3,07 (s, 6H); 3,58-3,64 (m, 1H); 3,97 (dd, $J = 10,9, 2,0$ Hz, 1H); 4,59 (bs, 2H); 5,45 (dd, $J = 11,0, 2,1$ Hz, 1H); 6,21 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H); 6,34 (dd, $J = 3,2, 2,0$ Hz, 1H); 7,51 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H); 7,79 (bs, 1H); 7,90 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,1; 36,4; 2 \times 36,9; 67,5; 80,2; 106,4; 110,3; 112,4; 135,4; 141,5; 150,9; 153,5; 153,7; 159,1.

Příklad 33 *2-(Methylamino)-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin* Připraven z 2-chlor-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2$, výtěžek (%): 79. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,98; 99,9. ESI $^+$ -MS m/z (rel. int. %, ion): 343,8 (100, [M+H] $^+$); 259,7 (32, [M-THP+H] $^+$). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,52-1,59 (m, 2H); 1,65-1,69 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,12-2,18 (m, 1H); 2,19 (s, 3H); 2,77 (d, $J = 4,6$ Hz, 3H); 3,57-3,62 (m, 1H); 3,97 (dd, $J = 10,9, 2,0$ Hz, 1H); 4,54 (bs, 2H); 5,42 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H); 5,93 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H); 6,08 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 6,37 (bs, 1H); 7,61 (vbs, 1H); 7,88 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13,3; 22,6; 24,6; 28,2; 30,2; 36,2; 67,6; 80,1; 106,3; 107,4; 112,9; 134,9; 150,1; 150,8; 151,5; 154,1; 159,8.



Příklad 34 2-(Dimethylamino)-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(5-methylfurfuryl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M

roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec: C₁₈H₂₄N₆O₂,

výtěžek (%): 86. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,90; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion):

5 357,8 (100, [M+H]⁺); 273,7 (20, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-

1,56 (m, 2H); 1,64-1,72 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,15-2,18 (m, 1H); 2,19 (s,

3H); 3,08 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,97 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 4,53 (bs, 2H); 5,45 (dd, *J* =

11,0, 2,1 Hz, 1H); 5,93 (dd, *J* = 2,9, 0,8 Hz, 1H); 6,08 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H); 7,71 (bs, 1H); 7,90 (s, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 13,2; 22,6; 24,6; 30,1; 36,3; 2 × 36,9; 67,5; 80,2; 106,3;

10 107,3; 112,4; 135,4; 150,0; 150,7; 151,6; 153,6; 159,1.

Příklad 35 2-(Dimethylamino)-6-benzylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin Připraven z 2-

chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku

15 dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₉H₂₄N₆O, výtěžek (%): 86.

HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 29,12; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 353,8 (100,

[M+H]⁺); 269,7 (78, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,57 (m, 2H);

1,63-1,72 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,19 (ddd, *J* = 24,0, 12,5, 3,7 Hz, 1H); 3,04

(s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,97 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 4,60 (bs, 2H); 5,45 (dd, *J* = 11,0, 2,1 Hz,

1H); 7,18 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,27 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,35 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H); 7,89 (s, 1H); 7,96 (bs,

20 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,1; 2 × 36,9; 43,0; 67,5; 80,2; 112,4; 126,4; 2 ×

127,4; 2 × 128,0; 135,3; 140,8; 150,6; 153,9; 159,2.

Příklad 36 2-(Dimethylamino)-6-[(4-methylbenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

25 Připraven z 2-chlor-6-[(4-methylbenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M

roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₆N₆O, výtěžek

(%): 82. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 30,32; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion):

367,8 (100, [M+H]⁺); 283,8 (29, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,59

(m, 2H); 1,63-1,72 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,14-2,19 (m, 1H); 2,23 (s, 3H);

30 3,04 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,97 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 4,55 (bs, 2H); 5,44 (dd, *J* = 11,0, 2,1

Hz, 1H); 7,07 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,23 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,89 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz,

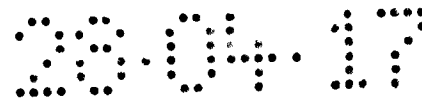
DMSO-*d*₆) δ (ppm): 20,6; 22,6; 24,6; 30,1; 2 × 36,9; 42,7; 67,5; 80,2; 112,4; 2 × 127,4; 2 × 128,6;

135,3; 135,4; 137,7; 150,6; 153,8; 159,2.

Příklad 37 2-(Dimethylamino)-6-[[4-(trifluormethyl)benzyl]amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-

9H-purin Připraven z 2-chlor-6-[[4-(trifluormethyl)benzyl]amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-

35



purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{20}H_{23}F_3N_6O$, výtěžek (%): 96. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 30,43; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 421,7 (100, [M+H]⁺); 337,8 (81, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-1,58 (m, 2H); 1,64-1,70 (m, 1H); 1,85 (dd, $J = 12,8, 1,8$ Hz, 1H); 1,93 (bd, $J = 13,4$ Hz, 1H); 2,15-2,23 (m, 1H); 3,00 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,97 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H); 4,66 (bs, 2H); 5,45 (dd, $J = 10,9, 1,7$ Hz, 1H); 7,54 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,64 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H); 7,91 (s, 1H); 8,10 (bs, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,1; 2× 36,8; 42,8; 67,5; 80,3; 112,4; 124,4 (q, ¹ $J_{CF} = 272,1$ Hz); 2× 125,0 (q, ³ $J_{CF} = 3,6$ Hz); 127,1 (q, ² $J_{CF} = 32,2$ Hz); 2× 127,9; 135,5; 145,7; 150,7; 153,8; 159,1.

10

Příklad 38 2-(Dimethylamino)-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(3-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{19}H_{24}N_6O_2$, výtěžek (%): 94. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,50; 99,5. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion):

15 368,8 (100, [M+H]⁺); 284,8 (53, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-1,58 (m, 2H); 1,63-1,73 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,90-1,95 (m, 1H); 2,15-2,23 (m, 1H); 3,04 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,96-3,98 (m, 1H); 4,53 (bs, 2H); 5,45 (dd, $J = 11,0, 1,8$ Hz, 1H); 6,55-6,57 (m, 1H); 6,75 (s, 1H); 6,76 (bs, 1H); 7,05 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,89 (s, 2H); 9,24 (bs, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,2; 36,9; 38,9; 39,1; 39,3; 39,5; 39,6; 39,8; 40,0; 42,9; 67,5; 20 80,3; 112,4; 113,4; 114,1; 118,0; 129,0; 135,3; 142,2; 150,7; 153,9; 157,2; 159,2.

Příklad 39 2-(Dimethylamino)-6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(4-hydroxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Světle žlutá pevná látka, sumární vzorec: $C_{19}H_{24}N_6O_2$,

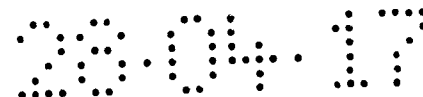
25 výtěžek (%): 76. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 26,12; 99,9. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion): 369,8 (100, [M+H]⁺); 285,7 (83, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,56 (m, 2H); 1,66-1,70 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,18 (ddd, $J = 24,0, 12,5, 3,7$ Hz, 1H); 3,06 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,95-3,98 (m, 1H); 4,48 (bs, 2H); 5,44 (dd, $J = 11,0, 1,5$ Hz, 1H); 6,65 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 7,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H); 7,80 (bs, 1H); 7,88 (s, 1H); 9,19 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,1; 2× 36,9; 42,4; 67,5; 80,2; 112,4; 2× 114,8; 2× 128,7; 130,9; 135,2; 150,6; 153,8; 156,0; 159,2.

30

Příklad 40 2-(Methylamino)-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 8M roztoku methylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: $C_{19}H_{24}N_6O_2$, výtěžek (%): 70. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 24,92; 98,0. ESI⁺-MS m/z (rel. int. %, ion):

35



369,8 (100, [M+H]⁺); 285,8 (29, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,57 (m, 2H); 1,62-1,72 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,16 (ddd, *J* = 24,1, 12,4, 3,5 Hz, 1H); 2,76 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H); 3,56-3,62 (m, 1H); 3,69 (s, 3H); 3,97 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 4,53 (bs, 2H); 5,41 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H); 6,33 (bs, 1H); 6,83 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,27 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H);
5 7,76 (bs, 1H); 7,86 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 28,3; 30,2; 42,1; 54,9; 67,6; 80,1; 112,9; 2× 113,4; 2× 128,7; 132,6; 134,8; 150,6; 154,3; 157,9; 159,9.

Příklad 41 2-(Dimethylamino)-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-[(4-methoxybenzyl)amino]-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 5,6M
10 roztoku dimethylaminu v absolutním ethanolu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₆N₆O₂, výtěžek (%): 93. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 28,85; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 383,8 (100, [M+H]⁺); 299,8 (82, [M-THP+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,51-1,59 (m, 2H); 1,63-1,72 (m, 1H); 1,83-1,86 (m, 1H); 1,91-1,94 (m, 1H); 2,18 (ddd, *J* = 24,0, 12,5, 4,0 Hz, 1H); 3,06 (s, 6H); 3,58-3,63 (m, 1H); 3,68 (s, 3H); 3,97 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 4,52 (bs, 2H); 5,44
15 (dd, *J* = 11,0, 2,1 Hz, 1H); 6,83 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H); 7,28 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H); 7,88 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 22,6; 24,6; 30,1; 2× 36,9; 42,4; 54,9; 67,5; 80,2; 112,4; 2× 113,4; 2× 128,7; 132,7; 135,2; 150,6; 153,8; 157,9; 159,2.

**B) Substituce 2-(dimethylamino)ethylaminem nebo 3-(dimethylamino)propylaminem –
20 typický postup**

Směs 2-chlor-6-substituovaného-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purinu (150 mg, 1 ekviv.) a 2-(dimethylamino)ethylaminu nebo 3-(dimethylamino)propylaminu (10 ekviv.) v *n*-butanolu (2,2 ml) byla zahřívána v tlakové ampuli pod Ar atmosférou 18 hodin při 120 °C. Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku a surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie
25 s využití mobilní směsi chloroform/methanol, začínající čistým chloroformem s následným gradientem methanolu.

Příklad 42 2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purin

Připraven z 2-chlor-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-9H-purinu a 2-(dimethylamino)ethylaminu. Pevná bílá látka, sumární vzorec: C₁₉H₂₇N₇O₂, výtěžek (%): 78. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 16,27; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 385,8 (100, [M+H]⁺). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,52-1,57 (m, 2H); 1,62-1,68 (m, 1H); 1,84-1,87 (m, 1H); 1,92-1,94 (m, 1H); 2,15-2,23 (m, 7H); 2,37 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 3,30-3,35 (m, 2H); 3,56-3,61 (m, 1H); 3,96-3,99 (m, 1H); 4,62 (bs, 2H); 5,41 (dd, *J* = 11,0, 1,8 Hz, 1H); 6,17 (bs, 1H); 6,20 (dd, *J* = 3,1, 0,6 Hz, 1H); 6,34 (dd, *J* = 3,4, 1,8 Hz, 1H); 7,51 (dd, *J* = 1,7, 0,8 Hz, 1H); 7,65 (bs, 1H); 7,87

(s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 22,6; 24,5; 30,0; 36,3; 3 \times 45,1; 58,3; 67,5; 80,3; 106,3; 110,31; 113,0; 135,0; 141,5; 150,9; 153,4; 154,2; 159,1.

Tabulka 1. Příklady připravených 9-(oxetan-2-yl)purinových derivátů.

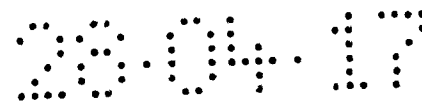
Látka	SUBSTITUENTY NA PURINU		CHN	MS
	C2	C6	ANALÝZA [%C; %H; %N]	ANALÝZA [M+H] ⁺
1	MeNH-	furfurylamino	60,0; 5,4; 28,0	301
2	EtNH-	furfurylamino	57,3; 5,8; 26,7	315
3	Me ₂ N-	furfurylamino	57,3; 5,8; 26,7	315
4	Et ₂ N-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
5	Me ₂ N-ethyl- NH-	furfurylamino	57,1; 6,5; 27,4	358
6	MeNH-	benzylamino	61,9; 5,9; 27,1	311
7	EtNH-	benzylamino	63,0; 6,2; 25,9	325
8	Me ₂ N-	benzylamino	63,0; 6,2; 25,9	325
9	Et ₂ N-	benzylamino	64,8; 6,9; 23,9	353
10	Me ₂ N-ethyl- NH-	benzylamino	62,1; 6,9; 26,7	368
11	MeNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,3; 7,0; 29,2	289
12	EtNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	59,6; 7,3; 27,8	303
13	Me ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	59,6; 7,3; 27,8	303
14	Et ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	61,8; 7,9; 25,4	331
15	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	59,1; 7,9; 28,4	346
16	MeNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	55,3; 6,6; 27,6	305
17	EtNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
18	Me ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
19	Et ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347
20	Me ₂ N-ethyl- NH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,5; 7,5; 27,1	362

21	MeNH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	55,3; 6,6; 27,6	305
22	EtNH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
23	Me ₂ N-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
24	Et ₂ N-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347
25	Me ₂ N-ethyl-NH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,5; 7,5; 27,1	362

Tabulka 2. Příklady připravených 9-(tetrahydrofuran-2-yl)purinových derivátů.

Látka.	SUBSTITUENTY NA PURINU		CHN	MS
	C2	C6	ANALÝZA [%C; %H; %N]	ANALÝZA [M+H] ⁺
26	MeNH-	furfurylamino	57,3; 5,8; 26,7	315
27	EtNH-	furfurylamino	58,2; 6,1; 25,6	329
28	propylNH-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
29	2-propylNH-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
30	Me ₂ N-	furfurylamino	58,2; 6,1; 25,6	329
31	Et ₂ N-	furfurylamino	60,7; 6,8; 23,6	357
32	Me ₂ N-ethyl-NH-	furfurylamino	58,2; 6,8; 26,4	372
33	Me ₂ N-propyl-NH-	furfurylamino	59,2; 7,1; 25,4	386
34	MeNH-	(3-methylfurfuryl)amino	58,5; 6,1; 25,6	329
35	EtNH-	(3-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
36	Me ₂ N-	(3-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
37	Et ₂ N-	(3-methylfurfuryl)amino	61,6; 7,1; 22,7	371
38	Me ₂ N-ethyl-NH-	(3-methylfurfuryl)amino	59,2; 7,1; 25,4	386
39	MeNH-	(4-methylfurfuryl)amino	58,5; 6,1; 25,6	329
40	EtNH-	(4-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
41	Me ₂ N-	(4-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
42	Et ₂ N-	(4-methylfurfuryl)amino	61,6; 7,1; 22,7	371

43	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methylfurfuryl)amino	59,2; 7,1; 25,4	386
44	MeNH-	(5-methylfurfuryl)amino	58,5; 6,1; 25,6	329
45	EtNH-	(5-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
46	Me ₂ N-	(5-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
47	Et ₂ N-	(5-methylfurfuryl)amino	61,6; 7,1; 22,7	371
48	Me ₂ N-ethyl- NH-	(5-methylfurfuryl)amino	59,2; 7,1; 25,4	386
49	MeNH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	55,8; 5,9; 24,4	345
50	EtNH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
51	Me ₂ N-	(3-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
52	Et ₂ N-	(3-methoxyfurfuryl)amino	59,1; 6,8; 21,8	387
53	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	56,8; 6,8; 24,4	402
54	MeNH-	(4-methoxylfurfuryl)amino	55,8; 5,9; 24,4	345
55	EtNH-	(4-methoxylfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
56	Me ₂ N-	(4-methoxylfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
57	Et ₂ N-	(4-methoxylfurfuryl)amino	59,1; 6,8; 21,8	387
58	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methoxylfurfuryl)amino	56,8; 6,8; 24,4	402
59	MeNH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	55,8; 5,9; 24,4	345
60	EtNH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
61	Me ₂ N-	(5-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
62	Et ₂ N-	(5-methoxyfurfuryl)amino	59,1; 6,8; 21,8	387
63	Me ₂ N-ethyl- NH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	56,8; 6,8; 24,4	402
64	MeNH-	benzylamino	63,0; 6,2; 25,9	325
65	EtNH-	benzylamino	63,9; 6,6; 24,8	339
66	Me ₂ N-	benzylamino	63,9; 6,6; 24,8	339
67	Et ₂ N-	benzylamino	65,6; 7,2; 22,9	367
68	Me ₂ N-ethyl- NH-	benzylamino	63,0; 7,1; 25,7	382
69	MeNH-	(3-hydroxybenzyl)amino	60,0; 5,9; 24,7	341
70	EtNH-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
71	Me ₂ N-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
72	Et ₂ N-	(3-hydroxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383



73	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-hydroxybenzyl)amino	60,4; 6,9; 24,7	398
74	MeNH-	(4-hydroxybenzyl)amino	60,0; 5,9; 24,7	341
75	EtNH-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
76	Me ₂ N-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
77	Et ₂ N-	(4-hydroxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383
78	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-hydroxybenzyl)amino	60,4; 6,9; 24,7	398
79	MeNH-	(3-methoxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
80	EtNH-	(3-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
81	Me ₂ N-	(3-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
82	Et ₂ N-	(3-methoxybenzyl)amino	63,6; 7,1; 21,2	397
83	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methoxybenzyl)amino	61,3; 7,1; 23,8	412
84	MeNH-	(4-methoxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
85	EtNH-	(4-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
86	Me ₂ N-	(4-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
87	Et ₂ N-	(4-methoxybenzyl)amino	63,6; 7,1; 21,2	397
88	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methoxybenzyl)amino	61,3; 7,1; 23,8	412
89	MeNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	59,6; 7,3; 27,8	303
90	EtNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,7; 7,7; 26,6	317
91	Me ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,7; 7,7; 26,6;	317
92	Et ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	62,8; 8,2; 24,4	345
93	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,1; 8,1; 27,3	360
94	MeNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
95	EtNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
96	Me ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
97	Et ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,0; 7,8; 23,3	361
98	Me ₂ N-ethyl-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-	57,6; 7,8; 26,1	376

	NH-	en-1-yl)amino		
99	MeNH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	56,6; 7,0; 26,4	319
100	EtNH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
101	Me ₂ N-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
102	Et ₂ N-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,0; 7,8; 23,3	361
103	Me ₂ N-ethyl-NH-	(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,6; 7,8; 26,1	376
104	MeNH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	56,2; 7,6; 26,2	321
105	EtNH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	57,5; 7,8; 25,1	335
106	Me ₂ N-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	57,5; 7,8; 25,1	335
107	Et ₂ N-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	59,6; 8,3; 23,2	363
108	Me ₂ N-ethyl-NH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	57,3; 8,3; 26,0	378

Tabulka 3. Příklady připravených 9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)purinových derivátů.

Látka	SUBSTITUENTY NA PURINU		CHN	MS
	C2	C6	ANALÝZA [%C; %H; %N]	ANALÝZA [M+H] ⁺
109	MeNH-	furfurylamino	58,5; 6,1; 25,6	329
110	EtNH-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
111	propylNH-	furfurylamino	60,7; 6,8; 23,6	357
112	2-propylNH-	furfurylamino	60,7; 6,8; 23,6	357
113	Me ₂ N-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
114	Et ₂ N-	furfurylamino	61,6; 7,1; 22,7	371
115	Me ₂ N-ethyl-NH-	furfurylamino	59,2; 7,1; 25,4	386
116	Me ₂ N-propyl-NH-	furfurylamino	60,1; 7,3; 24,5	400
117	MeNH-	(3-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
118	EtNH-	(3-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
119	Me ₂ N-	(3-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
120	Et ₂ N-	(3-methylfurfuryl)amino	62,5; 7,3; 21,9	385

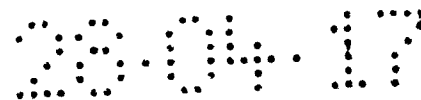
121	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methylfurfuryl)amino	60,1; 7,3; 24,5	400
122	MeNH-	(4-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
123	EtNH-	(4-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
124	Me ₂ N-	(4-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
125	Et ₂ N-	(4-methylfurfuryl)amino	62,5; 7,3; 21,9	385
126	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methylfurfuryl)amino	60,1; 7,3; 24,5	400
127	MeNH-	(5-methylfurfuryl)amino	59,6; 6,5; 24,5	343
128	EtNH-	(5-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
129	Me ₂ N-	(5-methylfurfuryl)amino	60,7; 6,8; 23,6	357
130	Et ₂ N-	(5-methylfurfuryl)amino	62,5; 7,3; 21,9	385
131	Me ₂ N-ethyl- NH-	(5-methylfurfuryl)amino	60,1; 7,3; 24,5	400
132	MeNH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
133	EtNH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
134	Me ₂ N-	(3-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
135	Et ₂ N-	(3-methoxyfurfuryl)amino	60,0; 7,1; 21,0	401
136	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methoxyfurfuryl)amino	57,8; 7,0; 23,6	416
137	MeNH-	(4-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
138	EtNH-	(4-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
139	Me ₂ N-	(4-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
140	Et ₂ N-	(4-methoxyfurfuryl)amino	60,0; 7,1; 21,0	401
141	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methoxyfurfuryl)amino	57,8; 7,0; 23,6	416
142	MeNH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	57,0; 6,2; 23,5	359
143	EtNH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
144	Me ₂ N-	(5-methoxyfurfuryl)amino	58,1; 6,5; 22,6	373
145	Et ₂ N-	(5-methoxyfurfuryl)amino	60,0; 7,1; 21,0	401
146	Me ₂ N-ethyl- NH-	(5-methoxyfurfuryl)amino	57,8; 7,0; 23,6	416
147	MeNH-	benzylamino	63,9; 6,6; 24,8	339
148	EtNH-	benzylamino	64,8; 6,9; 23,9	353
149	Me ₂ N-	benzylamino	64,8; 6,9; 23,9	353
150	Et ₂ N-	benzylamino	66,3; 7,4; 22,1	381

151	Me ₂ N-ethyl- NH-	benzylamino	63,8; 7,4; 24,8	396
152	MeNH-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
153	EtNH-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
154	Me ₂ N-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
155	Et ₂ N-	(3-hydroxybenzyl)amino	63,6; 7,2; 21,2	397
156	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-hydroxybenzyl)amino	61,3; 7,1; 23,8	412
157	MeNH-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,0; 6,3; 23,7	355
158	EtNH-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
159	Me ₂ N-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
160	Et ₂ N-	(4-hydroxybenzyl)amino	63,6; 7,2; 21,2	397
161	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-hydroxybenzyl)amino	61,3; 7,1; 23,8	412
162	MeNH-	(3-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
163	EtNH-	(3-methoxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383
164	Me ₂ N-	(3-methoxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383
165	Et ₂ N-	(3-methoxybenzyl)amino	64,4; 7,4; 20,5	411
166	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methoxybenzyl)amino	62,1; 7,3; 23,0	425
167	MeNH-	(4-methoxybenzyl)amino	61,9; 6,6; 22,8	369
168	EtNH-	(4-methoxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383
169	Me ₂ N-	(4-methoxybenzyl)amino	62,8; 6,9; 22,0	383
170	Et ₂ N-	(4-methoxybenzyl)amino	64,4; 7,4; 20,5	411
171	Me ₂ N-ethyl- NH-	(4-methoxybenzyl)amino	62,1; 7,3; 23,0	425
172	MeNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,7; 7,7; 26,6	317
173	EtNH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	61,8; 7,9; 25,4	331
174	Me ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	61,8; 7,9; 25,4	331
175	Et ₂ N-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	63,7; 8,4; 23,4	359
176	Me ₂ N-ethyl- NH-	(3-methylbut-2-en-1-yl)amino	61,1; 8,4; 26,3	374
177	MeNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
178	EtNH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347

179	Me ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347
180	Et ₂ N-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,9; 8,1; 22,4	375
181	Me ₂ N-ethyl-NH-	(<i>E</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,6; 8,0; 25,2	390
182	MeNH-	(<i>Z</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	57,8; 7,3; 25,3	333
183	EtNH-	(<i>Z</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347
184	Me ₂ N-	(<i>Z</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,9; 7,6; 24,3	347
185	Et ₂ N-	(<i>Z</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	60,9; 8,1; 22,4	375
186	Me ₂ N-ethyl-NH-	(<i>Z</i>)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)amino	58,6; 8,0; 25,2	390
187	MeNH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	57,5; 7,8; 25,1	335
188	EtNH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	58,6; 8,1; 24,1	349
189	Me ₂ N-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	58,6; 8,1; 24,1	349
190	Et ₂ N-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	60,6; 8,6; 22,3	377
191	Me ₂ N-ethyl-NH-	(4-hydroxy-3-methylbutyl)amino	58,3; 8,5; 25,0	392

Tabulka 4. Příklady připravených 9-(oxepan-2-yl)purinových derivátů.

Látka	SUSBTITUENTY NA PURINU		CHN	MS
	C2	C6	ANALÝZA [%C; %H; %N]	ANALÝZA
192	MeNH-	furfurylamino	59,6; 6,5; 24,5	343
193	EtNH-	furfurylamino	60,7; 6,8; 23,6	357
194	Me ₂ N-	furfurylamino	60,7; 6,8; 23,6	357
195	Et ₂ N-	furfurylamino	62,5; 7,3; 21,9	385
196	Me ₂ N-ethyl-NH-	furfurylamino	60,1; 7,3; 24,5	400
197	MeNH-	benzylamino	64,8; 6,9; 23,9	353
198	EtNH-	benzylamino	65,6; 7,2; 22,9	367



199	Me ₂ N-	benzylamino	65,6; 7,2; 22,9	367
200	Et ₂ N-	benzylamino	67,0; 7,7; 21,3	395
201	Me ₂ N-ethyl- NH-	benzylamino	64,5; 7,6; 23,9	410

Příklad 43

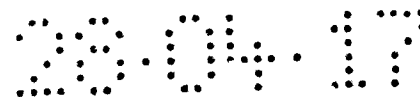
In vitro cytotoxická aktivita nových derivátů

5 Nízká cytotoxicita je nezbytná pro použití těchto látek v zemědělství. Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test je využíván v programech pro screening 10 léků a pro testy chemosensitivity. Testem se rozpoznají pouze životaschopné buňky. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných buněk v kultuře.

Myší fibroblasty NIH3T3; myší immortalizované mikrofágy kostní dřeně B2.4 a B10A.4, a lidské fibroblasty BJ (human foreskin fibroblasts) byly použity pro rutinní screening sloučenin. Buňky byly udržovány v Nunc/Corning 80 cm² plastických lahvích a pěstovány v mediu pro buněčné kultury (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml 15 streptomycinu, 10 % fetálního telecího séra a hydrogenuhličitan sodný).

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (2.500-30.000 buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), pipetovalo se 80 µl buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 20 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20 µl alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v čtyřnásobné řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 µM, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v triplicátech. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100 % 25 vlhkosti a v atmosféře 5% CO₂. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluorskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $IC_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}} / FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota IC₅₀, která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % 30 nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (Tabulka 5).

Nulová cytotoxicita je základním předpokladem pro použití těchto látek v zemědělských aplikacích. Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tabulka 5). Ukázalo se, že pro všechny testované nádorové linie bylo působení nových sloučenin srovnatelné,



kdežto nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Sloučeniny uvedené v Tabulce 5 je možné rozdělit do 2 skupin. První skupina obsahuje „klasické cytokininy“ reprezentované 6-substituovanými puriny (jejich působení je již známé). Druhá skupiny zahrnuje nové substituované 6-anilinopurinové deriváty. Tyto výsledky naznačují, že substituce v pozici 2 purinového skeletu vede obecně k poklesu cytotoxické aktivity ve srovnání s „klasickými cytokininovými“ analogy. Jak je ukázáno v tabulce 5, GI50 pro NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty byla vždy vyšší než 166,7 μM . Nové deriváty vykazují nulovou toxicitu pro normální i nádorové buňky v koncentracích okolo 166,7 μM a jsou proto mnohem vhodnější pro zemědělské a kosmetické aplikace než „klasické cytokininy“ (6-substituované deriváty purinu).

Nízká cytotoxicita (vysoká hodnota IC_{50}) je základním předpokladem pro použití těchto látek v kosmetických a medicínálních aplikacích. Nulová cytotoxická aktivita byla nalazena pro nové deriváty N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminu v porovnání s klasickými cytokininy, které jsou známé z předchozích vynálezů (kinetin, isopentenyadenin,...).

Tabulka 5: Cytotoxicita nových sloučenin pro různé normální buněčné linie / IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)

Sloučenina	B10A.4	B10A.4	BJ	NIH-3T3
Kinetin	>166,7	164,1	147,5	132,8
isopentenyadenin	>166,7	146,9	134,1	123,7
6-benzyladenin	>166,7	138,9	128,7	112,6
trans-zeatin	>166,7	>166,7	>166,7	154,9
meta-topolin	>166,7	178,4	165,7	167,2
ortho-topolin	87,5	94,3	107,8	94,1
Adenin	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
3	>166,7		>166,7	>166,7
9	>166,7		>166,7	>166,7
13	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
14	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
30	>166,7		>166,7	>166,7
39	>166,7		>166,7	>166,7
46	>166,7		>166,7	>166,7
47	>166,7		>166,7	>166,7
49	>166,7	>166,7	>166,7	>166,7
58	>166,7		>166,7	>166,7
59	>166,7		>166,7	>166,7
60	>166,7		>166,7	>166,7
75	>166,7		>166,7	>166,7
82	>166,7		>166,7	>166,7
84	>166,7		>166,7	>166,7
85	>166,7		>166,7	>166,7
87	>166,7		>166,7	>166,7
93	>166,7		>166,7	>166,7
99	>166,7		>166,7	>166,7
101	>166,7		>166,7	>166,7

103	>166,7		>166,7	>166,7
104	>166,7		>166,7	>166,7
105	>166,7		>166,7	>166,7
107	>166,7		>166,7	>166,7
108	>166,7		>166,7	>166,7
111	>166,7		>166,7	>166,7
114	>166,7		>166,7	>166,7
116	>166,7		>166,7	>166,7
119	>166,7		>166,7	>166,7
127	>166,7		>166,7	>166,7
132	>166,7		>166,7	>166,7

Příklad 44 Schopnost vychytávat volné radikály podle ORAC

Schopnost látek vychytávat volné radikály *in vitro* byla stanovena pomocí metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Ve stručnosti, 100 μ l fluoresceinu (500 mM) a 25 μ l roztoku zkoumané látky byly napipetovány do každé jamky 96jamkové mikrotitrační desky přehřáté na 37 °C. Samotná reakce byla spuštěna přidavkem 25 μ L 250 mM AAPH. Po 5 s třepání byla odečítána fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 510 nm) každé 3 min po dobu 90 min pomocí přístroje Infinite 200 (TECAN, Švýcarsko). Plocha pod křivkou byla použita k vyjádření antioxidační kapacity relativní vůči troloxu, který je používán jako standard. Látky s ORAC aktivitou vyšší než 1 jsou efektivnější než trolox, který je hydrofilním ekvivalentem vitamínu E. Kinetin, přirozeně se vyskytující cytokinin s antioxidačními vlastnostmi, byl přiřazen pro srovnání jako kontrola a jako látka známá ve stavu techniky.

15 Tabulka 6: Schopnost látek vychytávat volné radikály

Látka	ORAC (látka/trolox)
kinetin	0,201 \pm 0.5
155	2,422 \pm 0,107*
30	1,292 \pm 0,006
89	4,359 \pm 0,183
71	5,212 \pm 0,238
116	2,475 \pm 0,086
110	1,205 \pm 0,032
114	1,211 \pm 0,018
76	1,192 \pm 0,005
160	1,728 \pm 0,016
128	1,461 \pm 0,003
46	1,14 \pm 0,004
64	1,24 \pm 0,001

*Mean \pm SD (n=3)

Příklad 45 Aktivace transkripčního faktoru Nrf2

Schopnost látek aktivovat Nrf2-dependentní expresi byla stanovena pomocí reporterové linie EpRE-LUX. Ve stručnosti, látky v koncentracích 100, 10, 1 a 0.1 μM byly inkubovány 24 h s buňkami. Po lyzaci buněk (10 mM Tris, 2 mM DTT) byl přidán pufr s 0.2 mM luciferinem čímž se spustila luminiscenční reakce. Nárůst luminiscence byl měřen pomocí přístroje Infinite M200 (TECAN, Švýcarsko) a vyjádřen jako relativní přírůstek vůči dimethylfumarátu (DMF). Látky s Nrf2 aktivitou vyšší než 1 jsou efektivnější než dimethylfumarát (DMF), aktivátor Nrf2 schválený k léčbě psoriázy a roztroušené sklerózy. Všechny nově vyvinuté deriváty jsou aktivnější než kinetin, přirozeně se vyskytující cytokinin, který byl použit jako srovnávací látka a je známý ve stavu techniky.

10 Tabulka 7: Aktivace transkripčního faktoru Nrf2

Látka	Nrf2 (látka/DMF)
kinetin	0,04±0,00
155	0,24±0,07*
30	1,09±0,29
76	0,27±0,15
89	0,19±0,02
71	0,18±0
116	0,24±0,05
110	1,83±0,08
114	2,53±0,39
150	0,34±0,02
160	0,14±0,03
128	0,66±0,14
66	0,25±0,17
64	1,21±0,09

*Mean \pm SD (n=3)

Příklad 46 *Inhibice intracelulární produkce ROS pomocí látky 114*

Produkcce ROS v živých buňkách byla stanovena pomocí fluorescenční próby DCFH-DA. Stručně, látka 114 v koncentracích 100, 10, 1 a 0,1 μM byla inkubovaná 24 h s BJ kožními fibroblasty. Následně byly buňky opláchnuty fosfátovým pufrém a byla přidána látka DCFH-DA. Nárůst fluorescence byl odečítán každou minutu po dobu 20 min pomocí přístroje Infinite M200 (TECAN, Switzerland). Produkce ROS byla vyjádřena jako nárůst fluorescence během 20 min. Látka 114 signifikantně snižovala intracelulární produkci ROS *in vitro* v koncentraci $\geq 10 \mu\text{M}$.

Příklad 47 *Ochrana peroxidace membránových lipidů*

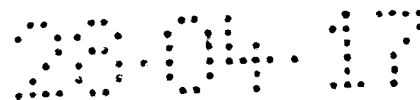
Typickým symptomem spojeným se stárnutím je jako přímý důsledek zvýšená koncentrace reaktivních forem kyslíku a peroxidace lipidů. Proto hladiny malonyldialdehydu (MDA), dekompozičního produktu peroxidace lipidů, byly měřeny v oddělených listech pšenice, které byly vystaveny účinku nových připravených derivátů a kinetinu po dobu čtyř dnů v temnu, jak je popsáno

v příkladu 7. Hladiny MDA byly měřeny za použití kyseliny thiobarbiturové (metoda TBA). V detailu, 100 mg čerstvého rostlinného materiálu se homogenizuje pomocí vysoké rychlosti třepání v kulovém mlýnu (MM301, Retsch, Německo) se 1 ml 80% metanolu. Surový extrakt byl centrifugován při 10 000 x g po dobu 5 minut a 100 µl alikvot supernatantu se smíchal se 100 µl 0,5% (w/v) TBA, obsahující 0,1% (w/v) kyseliny trichloroctové. Výsledný roztok byl poté inkubován po dobu 30 min při 95 °C. Vzorky byly rychle ochlazeny na ledu a centrifugovány 5 minut při 1000 x g. Absorbance supernatantu byla měřena při 532 nm s odečtením pozadí při 600 nm a množství MDA-TBA komplexu bylo vypočteno s využitím absorpčního koeficientu ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Nové deriváty významně snížily peroxidaci membránových lipidů ve srovnání s neošetřenou kontrolou (Tabulka 8 - hodnoty vyjadřují obsah MDA, produktu rozkladu membránových lipidů). Sloučeniny podle tohoto vynálezu výrazně snižují hladinu peroxidace membránových lipidů v živočišných buňkách, jak lze vidět z výsledků v tabulce 8.

Nově připravené deriváty obecného vzorce tak mají ochrannou funkci proti negativnímu působení reaktivních forem kyslíku, které se výrazně hromadí v tkáních.

Tabulka 8. Vliv nových sloučenin na peroxidaci membránových lipidů u NIH3T3 fibroblastů.

Sloučenina č.	MDA (nmol/g č.h.)
Kontrola	18,9 (±2,2)
kinetin	14,2 (±1,6)
3	12,4 (±1,1)
9	12,2 (±1,0)
13	13,1 (±1,1)
14	11,4 (±1,0)
30	12,6 (±1,1)
39	11,4 (±1,0)
46	11,2 (±1,5)
47	12,5 (±1,2)
49	12,3 (±1,0)
58	11,4 (±0,9)
59	11,5 (±1,0)
60	12,2 (±1,2)
75	11,7 (±1,2)
82	10,9 (±0,7)
84	10,6 (±0,8)
85	11,1 (±0,9)
87	10,4 (±1,0)
93	10,5 (±1,1)
99	10,2 (±0,9)



101	10,6 ($\pm 0,5$)
103	10,1 ($\pm 0,9$)
104	9,6 ($\pm 0,7$)
105	10,6 ($\pm 0,8$)
107	10,3 ($\pm 0,9$)
108	9,7 ($\pm 0,6$)
111	10,3 ($\pm 1,0$)
114	8,8 ($\pm 0,5$)
116	9,2 ($\pm 0,8$)
119	9,7 ($\pm 0,9$)
127	10,4 ($\pm 1,4$)
132	10,7 ($\pm 1,2$)

*č.h. – čerstvá hmota

Příklad 48 Amesův Test

- Testovaná substance (**114**) byla testována na mutagenitu bakteriálním testem reverzních mutací.
- 5 Provedení testu bylo založeno na metodě EU B.13/14 Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, která je analogem metodiky OECD Test Guideline No. 471. Byly použity čtyři indikátory kmene *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 a také byl použit jeden kmen *Escherichia coli* WP2 uvrA. Zkoušená látka se rozpustila v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byla testována v dávkách 10-1000 μg na jednu desku, která byla aplikována na plotny v objemu 0,1 ml.
- 10 Experimenty byly prováděny s metabolickou aktivací se supernatantem z krysích jater a směsí kofaktorů stejně jako bez metabolické aktivace. Pracovní postup byl proveden podle dokumentů Metody B. 13 / 14, Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, Council Regulation (EC) No.440/2008. Published in O. J. L 142, 2008 a podle metodiky OECD Test Guideline 471, Bacterial Reverse Mutation Test. Adopted July 21, 1997. Při testování v uspořádání uvedeném výše se
- 15 testovaná látka projevila jako nemutagenní pro všechny použité testovací kmeny s metabolickou aktivací stejně jako bez metabolické aktivace.

Příklad 49 Akutní Toxicita – procedura s fixní dávkou (v podkožním podání)

- Cíl této studie byl prozkoumat akutní toxický efekt testované substance po jednom podání podkožně
- 20 krysám Wistar. Testování bylo provedeno v souladu s metodikou: ČSN EN ISO 10993-11: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - část 11: Zkoušky na systémovou toxicitu a OECD Test Guideline No. 420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure adopted 17th December 2001. Testovaná substance **114** byla podána v jedné dávce jako roztok ve vehikulu (olivový olej) a byla aplikována podkožně samcům a samicím krys Wistar. Dávkování bylo provedeno postupně.
- 25 Předtestování látky (obervační studie) byla provedena s jednou samicí a jedním samcem pro každou dávku. Jako startovací dávka byla použito dávkování 30 mg/kg. Žádné ze zvířat neuhynulo po podání

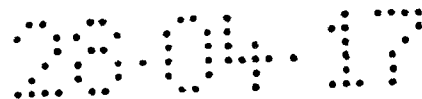
startovací dávky, a proto se pokročilo k zvýšení dávkování (100 mg/kg). Testovaná substance podána v dávkách 30 mg/kg a 100 mg/kg nezpůsobila uhynutí testovacích subjektů a nebyly pozorovány žádné klinické znaky intoxikace. Přítomnost podkožně aplikované testované substance při dávkování 30 mg/kg a 100 mg/kg byla pozorovatelná do druhého dne po aplikaci. Nebyly diagnostikovány žádné makroskopické změny v průběhu patologického vyšetření. Dle výsledků studie testované substance je Maximální tolerovaná dávka v podkožním podání v krysích samcích i samicích > 100 mg/kg.

Příklad 50 *Akutní dermální toxicita*

Testovaná substance 114 byla testována na akutní dermální toxicitu s použitím Wistar krys. Testování bylo provedeno v souladu s ČSN EN ISO 10993-11: Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - část 11: Zkoušky na systémovou toxicitu a také v souladu s OECD Test Guideline No. 402 Acute Dermal Toxicity adopted 24th February 1987. Studie byla provedena jako limitní test: dvě skupiny subjektů - 5 samců a 5 samic při dávkování 1000 mg/kg tělesné hmotnosti. Předtestování bylo provedeno s 1 samcem a 1 samicí z každé skupiny. Po pilotním experimentu byla i ostatní zvířata naaplikována. Testovaná substance byla aplikována ve formulaci na oholenou kůži pokusných zvířat a ponechána po dobu 24 hodin. Pokusná zvířata byla pozorována po 14 dní po vystavení testované substancí, poté byla pokusná zvířata usmrcena a byla provedena pitva s makroskopickým vyšetřením orgánů. Testovaná látka při dávce 1000 mg/kg tělesné hmotnosti nezpůsobila uhynutí pokusných zvířat. Nebyly pozorovány žádné klinické znaky toxicity v průběhu celé studie. Nebyly diagnostikovány žádné makroskopické změny v průběhu patologického vyšetření. Toxicita testované substance byla posuzována na základě úmrtnosti, změnách hmotnosti, klinických známkách toxicity v průběhu pozorovacího období a pitvy na konci studie. Vzhledem k výsledkům studie je hodnota Maximální tolerované dávky u testované substance vyšší než 1000 mg/kg tělesné hmotnosti.

Příklad 51 *In vitro test dráždivosti pokožky*

Testovaná substance byla testována v in vitro testu na dráždivost kůže v lidském epidermálním modelu EpiDerm™. Test byl proveden dle metodiky Method B.46. In vitro skin irritation: Reconstructed human epidermis model test and Protocol for: In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test For use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EPI-200-SIT (see par. 1.4, (1), (3)). Byly připraveny dva typy extraktů ve smyslu polární (voda) a nepochární (olivový olej) rozpouštědlo dle instrukcí daných normou ČSN EN ISO 10 993-12 (2012). Po preinkubaci tkáně bylo 30 µl extraktu umístěno přímo na povrch tkáně tak, aby překryl celý její povrch. Délka expozice byla 60 minut. Tři tkáňové kultury byly použity pro extrakt a pro každou kontrolu. Procedura byla provedena zvlášť pro každý extrakt. Po odstranění extraktů testovací substance z tkání, byla tkáň post inkubována po dobu 42 hodin kvůli zbytkům po opravách poškození. Tři hodinová inkubace s MTT a dvě hodiny extrakční periody vytřepávání následovaly. Optická hustota (OD570) extraktu isopropyl alkoholubyla změřena na spektrofotometru. Relativní buněčná životaschopnost byla vypočítána pro



každou tkáň jako % střední životaschopnosti negativní kontroly tkáně. Dle experimentů popsaných výše, průměrná životaschopnost tkání ošetřených testovacími substancemi ve vodním extraktu byla 99,0% a u testovací substance v extraktu s olivovým olejem byla 103,0%, což znamená, že životaschopnost byla > 50% v obou případech. Efekt testované substance **114** byl negativní v EpiDerm™ modelu (tkáň nebyla poškozena). Dle klasifikačních kritérií daných v kapitole 4.5. je testovaná substance považována, že nemá kategorii ve vztahu k dráždivosti kůže.

Příklad 52 *Test dráždivosti kůže*

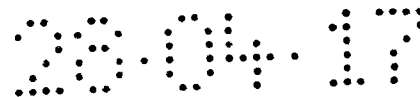
Testovaná substance **114** byla testována v zvířecím testu podráždění kůže. Králíci (Novozélandské albínské plemeno) byly použity pro tento test. Test byl proveden dle norem ČSN EN ISO 10993 (březen 2014): Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - část 10: Zkoušky dráždivosti a senzibilizace kůže, článek 6.3 Zkouška dráždivosti na zvířatech. Dávka 0.5 g testované substance byla aplikována na kůži na zádech na obou stranách králíka. S cílem prokázat citlivost pokusu, byla zahrnuta pozitivní kontrola (0,5g laurylsulfát). Zpočátku byl použit jeden králík (testovací zvíře č. 16). Dva další králíci (králík č. 17 a č. 18) byly použity pro potvrzující test. Na konci kontaktu (po 4 hodinách) byly odstraněny obvazy a zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému a odezva byla hodnocena po 1, 24, 48 a 72 hodinách po odstranění obvazu. Nebyly pozorovány žádné změny v hmotnosti zvířat. Během celé studie nebyly zjištěny žádné klinické známky systémové intoxikace. Primární index podráždění pro pozitivní kontrolu byl 1,67 (mírné), čímž byla zajištěna spolehlivost pozitivní kontroly. Bez zarudnutí a otoku bylo zaznamenáno po 1, 24, 48 a 72 hodinách v testovacích místech všech tří králíků. Primární index podráždění pro testovanou látku byl definován jako 0. Nebylo způsobeno žádné podráždění kůže po 4 hodinovém vystavení králíků testované substancí.

Příklad 53 *Přípravky*

Prostředky pro regulaci růstu obvykle obsahují 0,1 až 99 % z hmotnosti, obzvláště 0,1 až 95 % hmotnosti, směsi účinných látek obsahující N²,N⁶-disubstituovaný-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diamin podle tohoto vynálezu, 1 až 99,9 % hmotnosti pevné nebo kapalné přípravky, a od 0 do 25 % hmotnosti, obzvláště 0,1 až 25 % hmotnosti, povrchově aktivního činidla. Zatímco komerční produkty jsou obvykle formulovány jako koncentráty, konečný uživatel bude normálně používat zředěné formulace. Tyto prostředky mohou také obsahovat další přísady, jako jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový, řepkový olej nebo sójový olej), činidla proti pění, například silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojidla, látky způsobující lepivost a také hnojiva nebo jiné aktivní složky. Výhodné formulace mají zejména následující složení: (% = hmotnostní procenta):

<u>A1. Emulgovatelné koncentráty</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	5%	10%	25%	50%
dodecylbenzensulfonan vápenatý	6%	8%	6%	8%

	polyoxyetylovaný ricinový olej (polyglykol ether ricinového oleje) (36 mol ethylenoxid)	4%	-	4%	4%
5	oktylfenol polyglykol ether (7-8 mol ethylenoxid)	-	2 %	-	2 %
	cyklohexanon	-	-	10 %	20 %
	směs aromatických uhlovodíků C ₉ -C ₁₂	83 %	82 %	53 %	18 %
	Emulze o vyžadované finální koncentraci mohou být získány z takového koncentrátu zředěním vodou.				
10	<u>A2. Roztoky</u>	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	5 %	10 %	50%	90%
	1-methoxy-3-(3-methoxy- propoxy)-propan	-	20 %	20%	-
	polyethylenglykol MW 400	20%	10 %	-	-
15	N-methyl-2-pyrrolidon	-	-	30%	10%
	směs aromatických uhlovodíků	75 %	60 %	-	-
	Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapének.				
	<u>A3. Smáčivé prášky</u>	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
20	ligninsulfonan sodný	4 %	-	3 %	-
	laurylsulfát sodný	2 %	3 %	-	4 %
	diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	5 %	6 %
	oktylfenol polyglykol ether (7-8 mol ethylen oxid)	-	1 %	2 %	-
25	vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
	kaolín	87 %	61 %	37 %	-
	Aktivní složka je důkladně promísena s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.				
30	<u>A4. Suspenzní koncentrát</u>	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	3%	10%	25%	50%
	etylén glykol	5 %	5 %	5 %	5%
	nonylfenol polyglykol ether (15 mol etylén oxid)	-	1 %	2 %	-
35	lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
	karboxymethylcelulosa	1 %	1 %	1 %	1%
	37 % vodný roztok formaldehydu	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2%



emulze silikonového oleje	0.8 %	0.8 %	0.8 %	0.8%
voda	86 %	78 %	64 %	38%

Jemně rozemletá aktivní složka je smíchána s pomocnými látkami. Vzniklý suspenzní koncentrát umožňuje přípravu suspenze o požadované koncentraci zředěním vodou.

5 A5: Suché Kapsle

5000 Tobolek, z nichž každá obsahuje 0,25 g N²,N⁶-disubstituovaný-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminu, se připraví následujícím způsobem:

Složení: Léčivá látka: 1250 g; Talek 180 g; Pšeničný škrob: 120 g; Stearát hořečnatý: 80 g; Laktóza 20 g.

10 Postup přípravy: Rozetřené látky jsou tlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí stroje na plnění tobolek.

A6: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g N²,N⁶-disubstituovaný-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diamin jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

15 Složení: 250 g Účinná látka + 2l g Lauroglycol

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v Lauroglykol® (propylenglykol laurát, Gattefossé SA, Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

20 A7: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g N²,N⁶-disubstituovaný-9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diamin jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

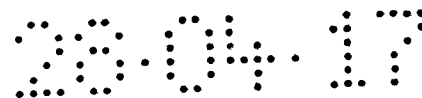
Složení: 250 g účinné složky v 1 l PEG 400, 1 litr Tween 80.

25 Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o mh mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween 80 (polyoxyetylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem Inc., Inc., USA. , dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

30 **Příklad 54** *Gelový přípravek*

Formulace mastí byla testována během pilotní klinické studie se 4 dobrovolníky s psoriázou, což je onemocnění kůže. Složky jsou uvedeny v gramech na 100 g.

látka	Obsah
Látka 114	1.0 g
Butylhydroxytoluenum	0.2 g
Butylparaben	0.2 g



Diethyleneglycol monoethyl ether	10.0 g
Silica colloidalis anhydrica	5.0 g
Propylene glycol laurate	83.6 g

Gel této konzistence může být navíc modifikován přidáním oxidu křemičitého, colloidalis anhydrica. Také se opět předpokládá, že transdermální systém Transcutol P / Lauroglycol FCC zvýší účinnost látky 114. Oxid křemičitý colloidalis anhydrica pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky.

5

Příklad 55 *Postup přípravy kožní masti*

Složky masti jsou uvedeny v gramech na 200 g:

Látka	Obsah
Látka 114	2.0 g
Butylhydroxytoluenum	0.4 g
Butylparaben	0.4 g
Diethyleneglycol monoethyl ether	20.0 g
Glycerol dibehenate	44.0 g
Propylene glycol laurate	133.2 g

Doporučený postup

10 Fáze A: 2 g látky **114** se rozpustí ve 20 g Transcutol P za stálého míchání při teplotě místnosti v oddělené skleněné nebo nerezové nádobě. Proces rozpouštění může být urychlen zahříváním roztoku na maximální teplotu 40 °C.

Fáze B: 0.4 g Nipanox BHT a 0,4 g Nipabutyl se rozpustí za stálého míchání ve 133,2 g Lauroglycolu FCC při teplotě přibližně 70 °C, v další samostatné skleněné nebo nerezové nádobě. Čirý olejovitý roztok se zahřívá na teplotu přibližně 80 °C a 44 g Compritol 888 ATO se taví v něm, za stálého míchání. Čirý olejovitý roztok se ochladí na cca 60 °C za stálého míchání a ochlazení a smísí se s fází A. Vzniklá bělavá mast je rozdělena na přibližně 15 g porce a plní se do předem připravených plastových nádob.

20 **Příklad 56** *Formulace přípravku pro lokální aplikaci na kůži*

Prostředek pro místní aplikaci na kůži obsahuje následující složky podle hmotnostních %:

Aktivní složka: Látka **114** 0,1%
 Olejová fáze: Cetylalkohol 5,0%
 Glycerylmonostearát 15,0%
 Sorbitanmonooleát 0,3%
 Polysorbát 80 USP 0,3%

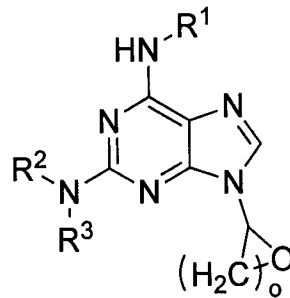
25

Vodná fáze: Methylcelulózová 100 cps 1.0%
Methylparaben 0,25%
Propylparaben 0,15%
Vyčištěná voda q.s. na 100%

- 5 Methylparaben a propylparaben se rozpustí v horké vodě a následně se v ní disperguje i methylcelulóza. Směs se pak ochladí na 60 °C, dokud se methylcelulóza nerozpustí. Směs se potom zahřívá na 72 °C a přidá se do olejové fáze, která se zahřívá na teplotu 70 °C za stálého míchání. 8-Amino-6-furfurylaminopurin se přidá při teplotě 35 °C a výsledná směs se míchá až do okamžiku rozptýlení. Tento prostředek se aplikuje na kůži přinejmenším každý den, dokud se nedosáhne požadovaného zmírnění stárnutí kůže (proti stárnutí).
- 10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminů, přičemž uvedené deriváty mají obecný vzorec I,



5

I

ve kterém

- 10 R^2 a R^3 jsou nezávisle vybrány z H, $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0$ nebo 1 nebo 2, $-CH_2(CH_3)_2$, $-(CH_2)_nN(CH_3)_2$, $n = 2$ nebo 3, přičemž alespoň jeden ze substituentů R^2 a R^3 je alkyl nebo dimethylaminoalkyl; n je celé číslo v rozmezí 2 až 5, tedy 2 nebo 3 nebo 4 nebo 5, přičemž vodík v alespoň jedné methylenové skupině (CH_2) v substituentu na N9 může být volitelně nahrazen methylem nebo
- 15 methoxy skupinou;
- R^1 je vybráno ze skupiny zahrnující
- furfuryl nebo furfuryl substituovaný alespoň jednou methylovou nebo methoxy skupinou,
 - benzyl nebo benzyl substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující methyl, trifluormethyl, hydroxy, methoxy, trifluormethoxy, halogen, amino, methoxycarbonyl a
 - 20 acetoxy,
 - 3-methylbut-2-en-1-yl,
 - 3-methylbut-3-en-1-yl,
 - 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl,
 - 4-hydroxy-3-methylbutyl,
- 25 a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo jejich adiční soli s kyselinami.

2. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminů podle nároku 1, vyznačené tím, že je-li R^2 nebo R^3 $-(CH_2)_nN(CH_3)_2$, je druhý z těchto substituentů vodík.

30

3. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9H-purin-2,6-diaminů podle nároku 1 nebo 2, vyznačené tím, že skupina $-N(R^2)(R^3)$ je vybrána ze skupiny zahrnující methylamino, ethylamino,

propylamino, 2-propylamino, dimethylamino, diethylamino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino.

4. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z
 5 předcházejících nároků, vyznačené tím, že R^1 je vybrán ze skupiny zahrnující furfuryl, 3-
 methylfurfuryl, 4-methylfurfuryl, 5-methylfurfuryl, 3-methoxyfurfuryl, 4-methoxyfurfuryl, 5-
 methoxyfurfuryl, benzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-(trifluormethyl)benzyl,
 3-(trifluormethyl)benzyl, 4-(trifluormethyl)benzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-
 hydroxybenzylamino, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 2-
 10 (trifluormethoxy)benzyl, 3-(trifluormethoxy)benzyl, 4-(trifluormethoxy)benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-
 fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-
 brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-jodbenzyl, 3-jodbenzyl, 4-jodbenzyl, 2-aminobenzyl, 3-aminobenzyl,
 4-aminobenzyl, 2-(methoxykarbonyl)benzyl, 3-(methoxykarbonyl)benzyl, 4-
 (methoxykarbonyl)benzyl, 2-acetoxybenzyl, 3-acetoxybenzyl, 4-acetoxybenzyl, 2,3-dihydroxybenzyl,
 15 2,5-dihydroxybenzyl, 3,4-dihydroxybenzyl, 3,5-dihydroxybenzyl, 2,3-dimethoxybenzyl, 2,5-
 dimethoxybenzyl, 3,4-dimethoxybenzyl, 3,5-dimethoxybenzyl, 2,6-difluorbenzyl, 3,4-difluorbenzyl,
 3,5-difluorbenzyl, 2,3-dichlorbenzyl, 2,4-dichlorbenzyl, 3,4-dichlorbenzyl, 3,5-dichlorbenzyl, 2-
 hydroxy-3-methylbenzyl, 2-hydroxy-5-methylbenzyl, 2-hydroxy-3-methoxybenzyl, 2-hydroxy-4-
 methoxybenzyl, 3-hydroxy-4-methoxybenzyl, 4-hydroxy-2-methoxybenzyl, 4-hydroxy-3-
 20 methoxybenzyl, 3-fluor-4-hydroxybenzyl, 3-chlor-4-hydroxybenzyl, 4-fluor-3-hydroxybenzyl, 4-
 chlor-3-hydroxybenzyl, 2-chlor-4-fluorbenzyl, 2-chlor-6-fluorbenzyl, 3,4,5-trihydroxybenzyl, 3,4,5-
 trimethoxybenzyl, 2,3,4-trifluorbenzyl, 2,3,6-trifluorbenzyl, 3,4,5-trifluorbenzyl, 4-hydroxy-3,5-
 dimethoxybenzyl, 3-methylbut-2-en-1-yl, 3-methylbut-3-en-1-yl, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl, -
 hydroxy-3-methylbutyl)amino.

25

5. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z
 předcházejících nároků, vyznačené tím, že substituent na N9 je vybrán z tetrahydro-2*H*-pyran-2-ylu a
 tetrahydrofuran-2-ylu, které mohou být volitelně substituované alespoň jednou, s výhodou jednou,
 methylovou nebo methoxylovou skupinou.

30

6. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle nároku 1 vybrané
 ze skupiny zahrnující 2-(methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin, 2-
 (ethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(dimethylamino)-6-
 furfurylamino-9-(tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(diethylamino)-6-furfurylamino-9-
 35 (tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin; 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-6-furfurylamino-9-
 (tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin;

2-(methylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purine, 2-(ethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(dimethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-(diethylamino)-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purin; 2-{{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-6-furfurylamino-9-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-9*H*-purine a jejich soli, ve kterých může být furfurylová skupina substituovaná alespoň jedním substituentem zvoleným z množiny zahrnující methyl nebo methoxy skupinu.

7. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití jako antioxidační, antisenescenční, antiaging a prodiferenční činidla pro inhibici nepříznivých metabolických procesů, inhibici peroxidace lipidů a proteinů a/nebo inhibici procesů stárnutí u rostlin a živočichů, zejména člověka.

8. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití jako léčiva a/nebo kosmetické přípravky.

9. N^2, N^6 -disubstituované deriváty 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro použití při léčbě kožních onemocnění, jakými je akné, erytém a zarudnutí, onemocnění zahrnujících oxidační stres v kůži, jakými jsou rakovina kůže, psoriáza, fibrózy u fibrotických poruch, jako je sklerodermie, reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), hypertrofické jizvy, nefrogenní systémové fibrózy, při léčbě lupenky, alergického ekzému, toxického ekzému, atopické dermatitidy, lichen planus, hyperpigmentace a leze herpes simplex, ichtyózy, papillomu, Bowenovy choroby, seboroické keratózy, aktinické keratózy, bazálního a spinocelulárního karcinomu, jako antineurodegenerativních léčiv, a pro potlačení imunostimulace, a/nebo pro léčení zánětu, zejména k urychlení hojení lézí, poskytnutí okamžité úlevy od bolesti a jiné imunologické odpovědi na zánět.

10. Použití N^2, N^6 -disubstituovaných derivátů 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 jako kosmetik pro inhibici, zlepšení a oddálení procesů stárnutí a senescence, a pro zlepšení vzhledu a kondice kůže.

11. Použití N^2, N^6 -disubstituovaných derivátů 9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 jako růstových regulátorů ve tkáňových kulturách pro stimulaci proliferace, morfogeneze a inhibici senescence; použití jako faktorů buněčného dělení a diferenciaci rostlin, savců, mikroorganismů, kvasinek a hub.

12. Farmaceutický a/nebo kosmetický přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden derivát N^2, N^6 -disubstituované-9-(2-oxacykloalkyl)-9*H*-purin-2,6-diaminu obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 a alespoň jednu pomocnou látku.

1/1

58

FV 2017-237

20.04.17

Obr. 1.

