

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2018-58

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

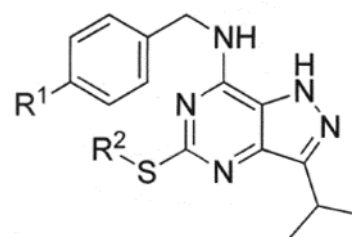
(22) Přihlášeno: **05.02.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2019**
(Věstník č. 33/2019)

(71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Libor Havlíček, Praha 4, Krč, CZ
Antonín Štunc, Praha 4, Modřany, CZ
Eva Řezníčková, Olomouc, Nová Ulice, CZ
Radek Jorda, Olomouc, Neředín, CZ
Vladimír Kryštof, Olomouc, CZ
Miroslav Strnad, Olomouc, Neředín, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice



(54) Název přihlášky vynálezu:
**5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-
pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny pro léčení
lymfomů**

(57) Anotace:
Řešení se týká 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-
1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů vzorce, které jsou
účinnými inhibitory kináz, a vykazují silné
antiproliferativní a proapoptotické účinky u
lymfomů. Řešení se dále týká způsobů jejich
přípravy. farmaceutických přípravků obsahujících
tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu lymfomů,
zejména Non-Hodgkinových lymfomů.

5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny pro léčení lymfomůOblast techniky

5

Tento vynález se týká 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů, způsobů jejich syntézy, přípravy farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu lymfomů.

10

Dosavadní stav techniky

Non-Hodgkinův lymfom (NHL) patří mezi nejčastější hematologická onemocnění, odpovídající přibližně 30% všech hematologických malignit. Díky své agresivitě je NHL rozdělován na dva typy, indolentní, pomalu rostoucí, a agresivní lymfomy s výraznou mitotickou aktivitou. Mezi agresivní lymfomy patří difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), Burkittův lymfom (BL), lymfom z pláštěvých buněk (MCL) a periferní T-lymfom (PTCL). K hlavním znakům NHL patří porušení regulace buněčného cyklu a programované buněčné smrti (apoptosy) způsobené např. mutacemi transkripčních faktorů MYC, TP53, TP63, BCL6, zvýšenou expresí cyklinu D, CDK4/6 nebo inaktivací genů kódujících RB1, CDKN2A a ATM. Inhibitory cyklin-dependetních kinas (CDK) zasahují do obou zmíněných procesů, jelikož blokují transkripci antiapoptotických proteinů s krátkým poločasem rozpadu (např. MCL1, XIAP, cyklin D1) a zároveň přímo inhibují klíčové regulátory buněčného cyklu - CDK. Lymfomy se souběžnými genetickými aberacemi genů MYC, BCL2 a BCL6 představují podskupinu chemoresistantního NHL s extrémně negativní prognózou (Rosenthal a Younes, Blood Rev. 2016, s. 6).

Různé CDK inhibitory (např. flavopiridol, roskovitin, dinaciclib a palbociclib) byly testovány na některých modelech NHL (Aleem E et Arceci RJ. Front Cell Dev Biol. 2015; 3: 16; Lacrima et al., Ann Oncol. 2005, 16:1169-1176). Bylo prokázáno, že agresivní lymfomy mohou být rozděleny na BCL2-dependetní a MCL1-dependetní podtypy, a že současná inhibice BCL2 a MCL1 vede k signifikantní cytotoxické synergii (Klanova et al., Clin Cancer Res., 2016: 1138-49, Wenzel a kol., Leukemia, 2013, 27 (6): 1381-90).

Potlačení exprese MCL1 dinaciclibem navozuje trvalou apoptotickou odpověď v agresivním B-buněčném lymfomu s deregulovaným transkripčním faktorem MYC in vivo (Gregory a kol., Leukemia, 2015, (6): 1437-41). Pokles hladiny MCL1 po působení dinaciclibu souvisí nejen se zablokováním transkripce, ale také s poklesem jeho fosforylace, která rozhoduje o stabilizaci MCL1 (Choudhary et al., Oncotarget. 2015 Jul 10; 6 (19): 16912-16925). Toto zjištění bylo potvrzeno nezávisle i na lymfomech s dvojitou aberací MYC-BCL2, kde pokles hladiny proteinu MCL1 v důsledku inhibice CDK senzibilizoval lymfomy k inhibitoru BCL2 venetoclaxu (Li et al., Leukemia, 2015 Aug. 29 (8): 1702-12).

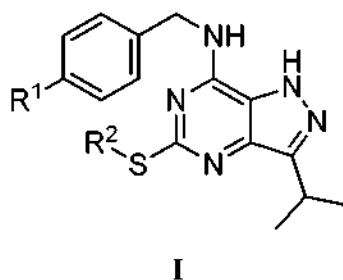
V současnosti jsou inhibitory CDK v pokročilých klinických studiích pro léčbu různých nádorových onemocnění. Inhibitory CDK4/6 palbociclib, ribociclib a abemaciclib byly nedávno schváleny US FDA pro léčbu první linie metastatického ER-pozitivního a HER2-negativního karcinomu prsu. Experimentální důkazy přitom naznačují, že inhibice CDK může mít pozitivní terapeutický účinek při léčbě nehodgkinských lymfomů.

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout nové a velmi účinné protinádorové sloučeniny, které mohou být využity pro léčbu lymfomů jakými jsou nehodgkinské lymfomy.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-

d]pyrimidiny pro léčení lymfomů obecného vzorce I



5 ve kterém,

R¹ je fenyl nebo heteroaryl s pěti až šesti atomy v kruhu, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; přičemž fenyl nebo heteroaryl může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny Cl, F, CF₃, NH₂, OH, NO₂, OCH₃, OCF₃;

R² je vybráno ze skupiny zahrnující:

- C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl, který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

- C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkenyl, který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

- C₃-C₆ cykloalkyl, kde cykloalkyl obsahuje 3 až 6 uhlíkových atomů, a je substituován alespoň jedním z těchto substituentů: hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

- lineární nebo rozvětvený heteroalkyl obsahující 2 až 6 atomů, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

- cykloheteroalkyl obsahující 3 až 6 atomů, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino, C1-C4 alkyl;

- cykloheteroalkyl-methyl, cykloheteroalkyl-ethyl nebo cykloheteroalkyl-propyl, přičemž cykloheteroalkyl je skupina popsána výše;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s kyselinami.

R¹ je s výhodou vybrán ze skupiny sestávající ze substituentů fenyl, pyridin-2-yl, pyridin-3-yl, pyridin-4-yl, pyrimidin-2-yl, pyrimidin-4-yl, pyrimidin-5-yl, pyrazin-2-yl, pyridazin-3-yl, pyridazin-4-yl, pyrrol-1-yl, pyrrol-2-yl, pyrrol-3-yl, pyrazol-1-yl, pyrazol-3-yl, pyrazol-4-yl,

imidazol-1-yl, imidazol-2-yl, imidazol-4-yl, furan-2-yl, furan-3-yl, thien-2-yl, thien-3-yl, oxazol-2-yl, thiazol-2-yl, tetrazol-5-yl; přičemž tyto substituenty mohou být nesubstituované nebo substituované jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny Cl, F, CF₃, NH₂, OH, NO₂, OCH₃, OCF₃.

5

S výhodou je **R**² hydroxy-substituovaný C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený C₂-C₅ alkyl substituovaný jednou nebo dvěma hydroxy skupinami. S výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethyl, 2- (RS, R or S)-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 1-hydroxybut-2-yl, 2-hydroxybut-2-yl, 1-hydroxy-3-methylbut-2-yl, 4-hydroxybut-2-(RS, R, or S)-yl, 2-hydroxy-2-methylpropyl, 3- hydroxy-3-methylbut-2-yl, (RS,R or S)-2,3-dihydroxypropyl, 1-hydroxy-3-methylbut-2-yl, and (3RS)- 2-hydroxypent-3 -yl.

10

V dalším výhodném provedení je C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný jednou nebo dvěma amino skupinami, popřípadě je aminoskupina dále substituována. S výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující: 2-aminoethyl, 3-aminopropyl, 4-aminobutyl, 5-aminopentyl, 6- aminohexyl, 2,3-diaminopropyl, (R)-2,3-diaminopropyl, (S)-2,3-diaminopropyl, 2-guanidinoethyl, and 2-ureidoethyl, 2-(acetylamino)ethyl, (dimethylamino)methyl, 2-(dimethylamino)ethyl, 3- (dimethylamino)propyl, 3-(dimethylamino)butyl, (diethylamino)methyl, 2-(diethylamino)ethyl, 3- (diethylamino)propyl a 4-(diethylamino)butyl.

15

20

V dalším výhodném provedení je C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný karbamoyl skupinou. S výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující (karbamoyl)methyl, 2-karbamoyl)ethyl, 3 -(karbamoyl)propyl.

25

V dalším výhodném provedení obsahuje lineární nebo rozvětvený heteroalkyl heteroatom O nebo S (tj. etherová nebo thioetherová struktura). S výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující methoxymethyl, ethoxymethyl, 2-(methylthio)ethyl.

30

V dalším výhodném provedení je C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl zároveň substituovaný amino a hydroxy skupinou. S výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující 3-amino-2-hydroxypropyl, (R)-3-amino-2-hydroxypropyl, and (S)-3-amino-2-hydroxypropyl, 2-amino-3-hydroxypropyl, (R)-2- amino-3-hydroxypropyl, and (S)-2-amino-3-hydroxypropyl.

35

S výhodou **R**² je C₂-C₃ lineární alkyl substituovaný jednou nebo dvěma sulfanylovými skupinami, nebo kombinací sulfanylové a hydroxyskupiny. S výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující 2- sulfanylethyl, 3-hydroxy-2-sulfanylpropyl, a 2-hydroxy-3-sufanylpropyl.

40

V dalším výhodném provedení je C₃-C₆ cykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl a cyklohexyl.

40

V dalším výhodném provedení je C₃-C₆ cykloalkyl substituovaný amino nebo hydroxy skupinou. S výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující: trans-4-aminocyklohexyl, cis-4-aminocyklohexyl, *cis*, *trans*--4-aminocyklohexyl, *cis*-2-aminocyklohexyl, *trans*-2-aminocyklohexyl, *cis,trans*--2-aminocyklohexyl, 3-aminocyklohexyl, *trans*-4-hydroxycyklohexyl, *cis*-4-hydroxycyklohexyl, *cis,trans*--4-hydroxycyklohexyl, *cis*-2-hydroxycyklohexyl, *trans*-2-hydroxycyklohexyl, *cis*, *trans*--2-hydroxycyklohexyl, 3-hydroxycyklohexyl.

45

50

V dalším výhodném provedení je **R**² cykloheteroalkyl, cykloheteroalkyl-methyl, cykloheteroalkyl- ethyl nebo cykloheteroalkyl-propyl obsahující dusík nebo kyslík nebo oba heteroatomy. S výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující: N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N- piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1- yl, (aziridin-1-yl)ethyl, (azetidín-1-yl)ethyl, (azolidin-1-yl)ethyl, (piperidin-1-yl)ethyl, (aziridin-1- yl)propyl, (azetidín-1-yl)propyl, (azolidin-1-yl)propyl a (piperidin-1-yl)propyl, 2-oxazolidon-5-yl.

55

V případě, že sloučeniny podle předloženého vynálezu mají chirální centrum, vynález zahrnuje všechny opticky aktivní isomery, jejich směsi i racemáty. Tedy sloučeniny obecného vzorce I, nezávisle na (R) nebo (S) konfiguraci na chirálních centrech, jsou zahrnuty v tomto vynálezu.

5

5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** jsou vhodné pro použití jako léčiva. Sloučeniny podle vynálezu zejména vykazují kombinovanou antiproliferační a proapoptotickou aktivitu, zejména vhodnou pro léčbu lymfomů.

10 V jednom provedení 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** jsou vhodné pro použití k léčbě krvních hyperproliferativních onemocnění. S výhodou jsou zejména vhodné pro použití k léčbě Non-Hodgkinových lymfomů.

15 V ještě dalším provedení 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** jsou vhodné pro použití pro inhibici kinas CDK1/2/5/7/9, které jsou klíčovými komponentami zapojenými v regulaci buněčného dělení krvních progenitorů, jejich diferenciaci a také ve vývoji lymfomů.

20 Dalším předmětem vynálezu je metoda léčby lymfomů spojených s aberantní buněčnou proliferací nebo apoptózou podáváním terapeuticky účinných dávek alespoň jedné ze sloučenin obecného vzorce **I**.

Vynález také zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** a farmaceuticky přijatelné nosiče.

25

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou deriváty obecného vzorce **I**, které nesou substituent **R²** vybraný ze skupiny zahrnující: 2-hydroxyethyl, 3-hydroxypropyl, 2(R)-hydroxypropyl, 2(S)-hydroxypropyl, 4-hydroxybut-2(R)-yl, 4-hydroxybut-2(S)-yl, 4-hydroxybut-2(R,S)-yl, 2-(hydroxy-2-methyl)propyl, 2,3-dihydroxypropyl, 3-hydroxy-3-methylbutyl, 2-hydroxypent-3-yl, (R)-1-isopropyl-2-hydroxyethyl, (S)-1-isopropyl-2-hydroxyethyl, (R,S)-1-isopropyl-2-hydroxyethyl, 2-aminoethyl, 3-aminopropyl, 4-aminobutyl, 5-aminopentyl, 6-aminoethyl, 3-amino-2-hydroxypropyl, 2,3-diaminopropyl, 1-(dimethylamino)methyl, 2-(dimethylamino)ethyl, 3-(dimethylamino)propyl, 4-(dimethylamino)butyl, 2-(diethylamino)ethyl, 3-(diethylamino)propyl, *cis*-2-aminocyklohexyl, *trans*-2-aminocyklohexyl, *cis,trans*-2-aminocyklohexyl, *cis,trans*-3-aminocyklohexyl, *trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-4-aminocyklohexyl, *cis,trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-2-hydroxycyklohexyl, *trans*-2-hydroxycyklohexyl, *cis,trans*-2-hydroxycyklohexyl, *cis,trans*-3-hydroxycyklohexyl, *trans*-4-hydroxycyklohexyl, *cis*-4-hydroxycyklohexyl, *cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl.

40

ZPŮSOBY PŘÍPRAVY SLOUČENINY OBECNÉHO VZORCE I

V této nové generaci 5,7-disubstituovaných 3-isopropylpyrazolo-1(2)H-[4,3-d]pyrimidinů je substituent (alkylaminoskupina) v poloze 5 centrálního heterocyklu nahrazena alkylthioskupinou. Tato substituce heterocyklu je synteticky lépe proveditelná (alkylace probíhá za mírných podmínek). Ve srovnání s původní 5-alkylaminoskupinou, která se provádí nukleofilní aromatickou substitucí, typicky vyžadující aktivaci teplotou 150 °C, jsou tak omezeny nežádoucí reakce. Poslední substituent zaváděný reakční sekvencí do polohy 5-heterocyklu je zde připojen k heterocyklu reakcí reaktivní sulfanylové skupiny, což také dovoluje velkou variabilitu zaváděných substitucí (reakce s alkylhalogenidy, epoxidy, aziridiny etc.).

50

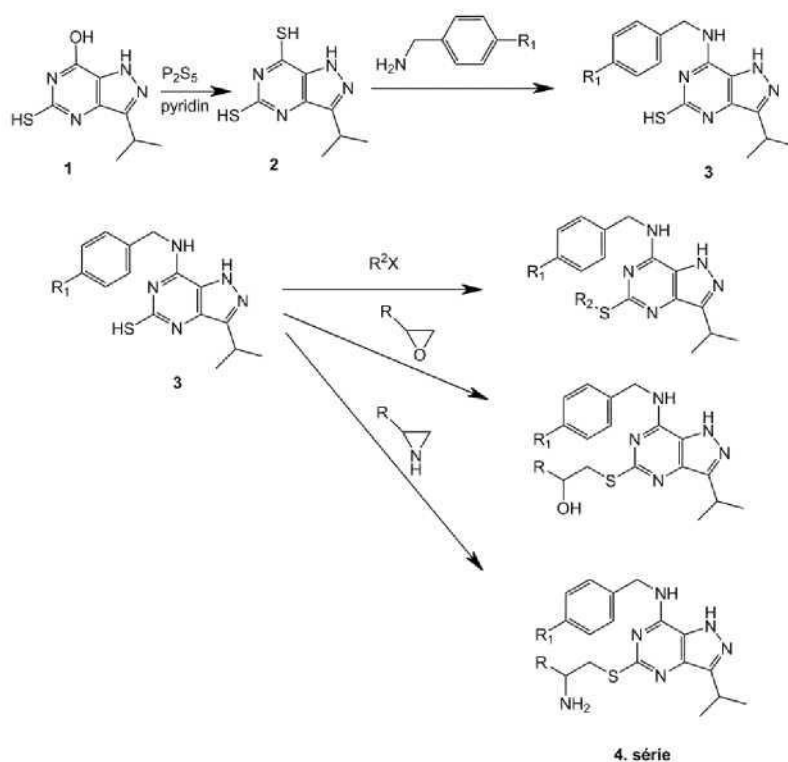


Schéma 1. Schéma syntézy 5-alkylthio-7-(4-arylbenzyl)amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu: 3-Isopropyl-5-sulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-ol (**1**)^x je přeměněn sulfidem fosforečným na 5,7-disulfanylderivát (**2**). Nukleofilní aromatickou substitucí sulfanylové skupiny v poloze 7 heterocyklu vzniká za mírných podmínek 7-[(4-arylbenzyl)amino]-5-sulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**3**). Alkylací thiolu (**3**) organickým halogenidem, oxiranem nebo aziridinem se připraví cílová struktura (**4**).

FARMACEUTICKÉ KOMPOZICE

Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intratekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, 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 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. 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. 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 suspenze mohou obsahovat látky

zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulosity, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu. Olejové suspense obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje 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, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitamínu E, β -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 polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké 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“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoseé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, 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.

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 přídavkem dalších neutrálních látek.

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 karboxymethylcelulosity a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítěný 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 stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči 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 acetylcelulosafталát nebo hydroxypropylmethylcelulosafталát. Barviva nebo pigmenty 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 nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafinový 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.

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 karboxymethylcelulosity, 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 konzervační aditiva 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 parafiny, 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 steryl 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.

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.

55

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 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 zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávačla jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky 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 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 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.

Objasnění výkresů

Obrázek 1 ukazuje antiproliferační aktivitu látky **4.9** v asynchronních buněčných liniích MINO and UPF1H po dobu 24 hodin

Obrázek 2 ukazuje vliv pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu **4.9** na apoptosu ovlivněných lymfomových linií MINO and UPF1H. Aktivita kaspas 3 a 7 byla stanovena v buněčném lyzátu s použitím fluorescenčního substrátu Ac-DEVD-AMC (šedé sloupce) či ještě v přítomnosti kaspasového inhibitoru Ac-DEVD-CHO (bílé sloupce).

Obrázek 3 ukazuje analýzu exprese apoptotických proteinů pomocí imunoblotingu v buněčné linii MINO, která byla ovlivněna různými koncentracemi látky **4.9** po dobu 24 hodin (levý panel) nebo byla ovlivněna látkou **4.9** o finální koncentraci 12,5 nM v různých časech (pravý panel). Expresse aktinu byla provedena pro kontrolu rovnoměrného nanesení proteinů na gel.

Obrázek 4 ukazuje analýzu exprese význačných regulátorů buněčného cyklu pomocí imunoblotingu v buněčné linii MINO, která byla ovlivněna různými koncentracemi látky **4.9** po dobu 24 hodin (levý panel) nebo byla ovlivněna látkou **4.9** o finální koncentraci 12,5 nM v různých časech (pravý panel). Expresse aktinu a PCNA byla provedena pro kontrolu rovnoměrného nanesení proteinů na gel.

Obrázek 5 popisuje inhibiční efekt pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu **4.9** na růst nádorů odvozených od lymfomové buněčné linie MINO. Myši nesoucí tumory byly léčeny látkou **4.9** (intravenózní podání) v uvedených dávkách a po 24 hodinách byly uspány, tumory byly vyoperovány a analyzovány pro obsah uvedených proteinů (A). Panel B ukazuje křivky přežití léčených myší po aplikaci látky **4.9** (různé dávky, různé typy podání). Panel C vyjadřuje růstovou křivku nádorů v porovnání s neovlivněnými nádory po aplikaci látky **4.9** intravenózně v dávce 10 mg/kg.

Příklady uskutečnění vynálezu

Spektra NMR byla změřena přístrojem JEOL ECA-500 pracujícím při frekvencích 500.16 MHz (1H) a 125.76 MHz (13C). Chemické posuny 1H NMR a 13C NMR spekter jsou vztaženy k zbytkovým signálům rozpouštědel; 1H: δ (CHCl₃) = 7.25 ppm, δ (DMSO-d₅) = 2.50 ppm, δ (CD₃OH) = 3.31 ppm; 13C: δ (CDCl₃) = 77.23 ppm, δ (DMSO-d₆) = 39.52 ppm, δ (CD₃OD) = 49.15 ppm. Chemické posuny jsou uváděny v δ škále [ppm] a interakční konstanty v Hz. Body tání byly měřeny na Koflerově přístroji a nebyly korigovány. Použité reagenty byly buď z komerčních zdrojů nebo byly syntetizovány dle uvedeného literárního odkazu. Tenkovrstevná chromatografie (TLC) byla prováděna na hliníkových deskách s vrstvou silikagelu F²⁵⁴ fy. Merck. Skvrny sloučenin byly detekovány fluorescencí vyvolanou UV světlem (254 nm). Hmotová spektra při ionizaci ESI nebo APCI byla získána na přístroji Waters Micromass ZMD (roztok v MeOH, přímý vstup, coin voltage se pohyboval v rozmezí 10-30 V, stopa HCOOH nebo NH₄OH byla obvykle použita k podpoře ionizace). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna s použitím silikagelu Kieselgel 60 (230-400 mesh). Čistota všech cílových syntetizovaných sloučenin byla stanovena chromatografií HPLC-PDA (200-500 nm), popřípadě také titračně. Specifická optická rotace opticky aktivních sloučenin byla změřena na polarimetru polAAR 3001 (vlnová délka: 589.0 nm, optická dráha: 50 mm, při 23 °C). Všechny testované sloučeniny vykazaly při CHN analýze hodnoty v rozmezí (+0.4%) teoretických.

Příklad 1. Příprava: 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů:

3-Isopropyl-5-sulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-ol: Byl připraven podle literatury (J. Med. Chem. 2011, 54, 2980-2993).

3-Isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (2)

K roztoku sulfidu fosforečného (93g, 0.42 mol) v pyridinu (550 mL) byl přidán při 75 °C 3-isopropyl- 5-sulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-ol (1) (74 g, 0,35 mol). Reakční směs byla zahřívána 3 h k refluxu v dusíkové atmosféře. Směs byla zahuštěna oddestilováním pyridinu (za mírně sníženého tlaku) na sirupovitou konzistenci a pomalu byla při teplotě 65-75 °C přidána demineralizovaná voda (aprox. 400 mL). Výsledná pěnicí suspence byla zahřívána za míchání na 95 °C po dobu 1.5 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu produkt vykristalizoval, byl odfiltrován, promyt vodou a nakonec ethanolem (ca. 200 mL). Vysušením ve vakuu při 75 °C bylo získáno 61.7 g [titračně (SH), 99.1%], výtěžek 76%. Analytický vzorek byl překrystalován z THF, b.t. 283 - 293 °C, UV (nm): 274 λ_{\max} , 320 λ_{\max} , 372 sh. MS APCI + m/z 227.1 (M + H)⁺, APCI and ES - m/z 225.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-d₆): 1,19 (d, J = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 13.21 (bs, 1H); 13.30 (bs, 1H); 13.78 (bs, 1H). ¹³C (125 MHz; DMSO-d₆): 21.9; 24.8; 121.5; 133.0; 143.4; 170.1; 175.1. Anal. (C₈H₁₀N₄S₂) C, H, N, S.

3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiol (3.1.)

4-(2-Pyridyl)benzylamin (26.2 g; 0.14 mol) byl rozpuštěn (50 °C) v 2-methoxyethanolu (150 mL) a *3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (2)* (23 g, 0.10 mol) byl přidán v atmosféře dusíku a reakční směs zahřívána 8 h k refluxu. Produkt reakce vykristalizoval během postupného ochlazení na teplotu 5-10 °C a byl odfiltrován. Po promytí nejprve 2-methoxyethanolem pak THF a po vysušení ve vakuu při 75 °C, bylo získáno 30 g produktu, ve výtěžku 78%. Titrace 0.1N HClO₄ v AcOH ukazuje 100% produktu. Analytický vzorek byl překrystalován z DMSO/H₂O, vysušen při 75 °C ve vakuu; b.t. 263 - 272 °C, UV (nm): 255 λ_{\max} , 289 λ_{\max} , 336 λ_{\max} . MS ESI + 377.1 (M + H)⁺, ESI - 375.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-d₆): 1.24 (d, J = 7.03 Hz, 6H); 3.32 (bs, 1H); 3.45 (bs, 1H); 4.80 (bs, 2H); 7.31-7.33 (m, 1H); 7.46 (bd, J = 6.42 Hz, 2H); 7.83 - 7.86 (m, 1H); 7.91-7.93 (m, 1H); 8.04 (bd, J = 7.34 Hz, 2H); 8.64 (bd, J = 3.97 Hz, 1H). ¹³C (125 MHz; DMSO-d₆): 21.7; 42.5; 54.8; 120.0, 122.4, 126.1, 127.7, 137.0, 149.4, 155.7. Anal. (C₂₀H₂₀N₆S) C, H, N, S.

3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiol (3.2.)

4-(Pyrazol-1-yl)benzylamin (12.2 g; 0.07 mol) byl rozpuštěn (50 °C) v 2-methoxyethanolu (75 mL) a 3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (**2**) (13.3 g, 0.059 mol) byl přidán v atmosféře dusíku. Reakční směs zahřívána 12 h na 120 °C. Produkt reakce vykristalizoval po ochlazení na teplotu 10 - 15 °C a byl odfiltrován. Po promytí 2-methoxyethanolem pak THF a po vysušení ve vakuu při 75 °C, bylo získáno 13.7 g produktu, ve výtěžku 62%. Analytický vzorek byl překrystalován z DMSO/H₂O, vysušen při 75 °C ve vakuu; b.t. 268-270 °C (rozklad), UV (nm): 268 λ_{\max} , 288 λ_{\max} , 300 λ_{sh} , 336 λ_{\max} . MS ESI + 366.1 (M + H)⁺, ESI - 364.1 (M - H)⁻. NMR ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.23 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.44 (bs, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.75 (d, *J* = 6.11 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 6.50 - 6.51 (m, 1H, H_{Ar}); 7.46 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.71 (d, *J* = 1.53 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.79 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.45 (d, *J* = 2.45 Hz, 1H, H_{Ar}); 9.17 (bs, 1H, -NH-); 12.23(bs, 1H, -NH); 13.74 (bs, 1H, -SH). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.8; 42.4; 107.7; 118.3; 127.6; 128.7; 138.7; 140.8. Anal. (C₁₈H₁₉N₇S) C, H, N, S.

3-isopropyl-7-[4(imidazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiol (3.3.)

4-(Imidazol-1-yl)benzylamin (2.4 g; 0.014 mol) byl rozpuštěn (50 °C) v 2-methoxyethanolu (15 mL) a 3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (**2**) (1.9 g, 0.008 mol) byl přidán v atmosféře dusíku. Reakční směs byla 15 h refluxována. Produkt reakce vykristalizoval po odpaření rozpouštědla a po několikadenním stání v THF. Produkt byl odfiltrován, promyt minimálním množstvím chladného methoxyethanolu pak THF. Po vysušení ve vakuu při 75 °C bylo získáno 2 g produktu, ve výtěžku 66%; b.t. 210 - 215 °C, UV (nm): 252 λ_{\max} , 270 λ_{\max} , 289 λ_{\max} , 297 λ_{sh} , 337 λ_{\max} . MS ESI + 366.1 (M + H)⁺, ESI - 364.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.23 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.44 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.75 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH-CH₂-); 7.08 (s, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.60 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.70 (s, 1H, H_{Ar}); 8.22 (s, 1H, H_{Ar}); 9.21 (bs, 1H, -NH), 12.20 (bs, 1H, -NH), 13.75 (s, 1H, -SH). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15.1, 21.8, 42.3, 64.9, 118.0, 120.3, 128.3, 129.0, 129.8, 135.5, 135.8. Anal. (C₁₈H₁₉N₇S) C, H, N, S.

3-isopropyl-7-[4(pyrazin-2-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiol (3.4.):

4-(Pyrazin-2-yl)benzylamin (0,93 g; 2,5 mmol) byl rozpuštěn (50 °C) v 2-methoxyethanolu (6 mL) a 3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (**2**) (1.13 g, 5 mmol) byl přidán v atmosféře dusíku. Reakční směs 9 h refluxována. Po ochlazení na teplotu asi 10 - 15 °C byl krystalický produkt odfiltrován a promyt THF. Po vysušení ve vakuu při 75 °C, bylo získáno 1.29 g produktu, ve výtěžku 68%; b.t. 265 - 267 °C, UV (nm): 256 λ_{\max} , 292 λ_{\max} , 301 λ_{sh} . MS ESI + 378.2 (M + H)⁺, ESI - 376.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.45 (bs, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.80 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, NH-CH₂-); 7.49 (bd, *J* = 5.81 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.10 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, H); 8.58 (s, 1H, H_{Ar}); 8.69 (s, 1H, H_{Ar}); 9.23 (bs, 2H, H_{Ar} + -NH); 12.20 (bs, 1H, -NH), 13.75 (s, 1H, -SH). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.8, 42.6, 126.7, 128.0, 128.3, 134.5, 141.9, 143.3, 144.3, 151.2. Anal. (C₁₉H₁₉N₇S) C, H, N, S.

3-isopropyl-7-[4(1H-imidazol-4-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiol (3.5.):

4-(1H-imidazol-4-yl)benzylamin (1,03 g; 6 mmol) byl rozpuštěn (50 °C) v 2-methoxyethanolu (7 mL) a 3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-dithiol (**2**) (1.01 g, 4,5 mmol) byl přidán v atmosféře dusíku. Reakční směs 10 h refluxována. Po ochlazení na teplotu asi 10 - 15 °C byl krystalický produkt odfiltrován a promyt THF. Po vysušení ve vakuu při 75 °C, bylo získáno 1.29 g produktu, ve výtěžku 68%; b.t. 285-290 °C (rozklad), UV (nm): 270 λ_{\max} , 289 λ_{\max} , 299 λ_{sh} , 336 λ_{\max} . MS ESI + 366.1 (M + H)⁺, ESI - 364.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.12 (s, 1H, -CH-); 3.45 (bs, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.70 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, NH-CH₂-); 7.34 (bs, 2H, H_{Ar}); 7.67 - 7.71 (m, 3H, H_{Ar}); 8.09 (s, 1H,

H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 21.9; 42.6; 48.6; 64.9; 115.0; 124.5; 127.9; 136.6; 136.3. Anal. (C₁₈H₁₉N₇S) C, H, N, S.

5-*(2-Hydroxy-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.1.)*

a) K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (200 mg, 0.54 mmol) v DMF (6 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.2 g) a 2-bromoethanol (45 μL, 0.6 mmol) a směs byla intenzivně míchána 1h při laboratorní teplotě. Pak byla reakční směs zahuštěna při teplotě do 50 °C na rotační vakuové odparce a zbytek byl roztřepán mezi CHCl₃ a H₂O. Spojené organické faze byly vysušeny (Na₂SO₄) a odpařeny ve vakuu. Produkt byl krystalizován z CHCl₃/Et₂O, a bylo získáno 0.18 g produktu, ve výtěžku 80%.

b) K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (4 mL) byl přidán oxiran (80 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 h. Produkt byl izolován jako precipitát po přidání vody. Produkt pak byl krystalován z CHCl₃/Et₂O a bylo získáno 0.36 g produktu, ve výtěžku 86%.

Analytický vzorek byl rekrystalizován ze stejné soustavy, b.t. 145 – 150 °C, UV (nm): 246 λ_{max}, 275 sh 316 sh. MS ESI + 443.2 (M + Na)⁺, ESI - 419.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.21 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.12 - 3.14 (m, 2H, -CH₂-); 3.17 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.78 - 3.80 (m, 2H, -CH₂-); 4.82 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.04 - 7.07 (m, 1H, H_{Ar}); 7.30 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.45 (bs, 1H, -NH-); 7.53 - 7.59 (m, 2H, H_{Ar}); 7.80 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.47 - 8.48 (m, 1H, H_{Ar}); 11.73 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.3; 26.0; 33.9; 43.8; 63.5; 119.9; 121.9; 126.6; 128.2; 136.5; 138.3; 138.6; 149.2; 156.1; 162.1. Anal. (C₂₂H₂₄N₆OS) C, H, N.

5-*(Prop-2-en-1-yl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.2.):*

K suspenzi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.00 mmol) v H₂O (20 mL) byl přidán roztok 1N NaOH (1.4 mL), allylbromid (0.13 mL, 1.1 mmol) a reakční směs byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě 6h. Produkt byl odfiltrován a dále byl krystalizován z CHCl₃/Et₂O. Bylo získáno 0.28 g produktu, ve výtěžku 67%, b.t. 148 - 150 °C. MS ESI + 417.2 (M + H)⁺, ESI - 415.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-d₆): 1.36 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.27 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.73 (d, *J* = 7.03 Hz, 2H, -S-CH₂-CH); 4.75 (bs, 2H, NH-CH₂-); 5.01 (dd, *J* = 9.78 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, CH_αH_β=CH-); 5.22 (dd, *J* = 16.96 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, CH_αH_β=CH-); 5.94 (ddt, *J* = 16.81 Hz, *J* = 9.93 Hz, *J* = 7.03 Hz, 1H, CH₂=CH-CH₂-); 7.31 (qd, *J* = 7.39 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 1.22 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.47 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.84 (td, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.05 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.26 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 8.64 (qd, *J* = 4.86 Hz, *J* = 1.83 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 12.56 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; DMSO-d₆): 21.6; 25.8; 33.0; 42.9; 116.7; 120.0; 122.4; 126.5; 127.8; 134.9; 137.0; 137.5; 139.8; 149.4; 155.7; 160.1. Anal. (C₂₃H₂₄N₆S) C, H, N.

5-*(2-Hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.3.)*

K směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán methyloxiran (130 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 6 h. Surový produkt byl získán vysrážením vodou z reakční směsi a byl dále vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu postupně v soustavě 1%, 2%, and 3% MeOH v CHCl₃. Produkt byl krystalizován z DCM/Et₂O a bylo získáno 0.30 g produktu, ve výtěžku 69%,

b.t. 144 - 146 °C. MS ESI + 435.2 (M + H)⁺, ESI - 433.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.21 (d, *J* = 6.11 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.25 (d, *J* = 6.42 Hz, 3H, -CH₃); 3.05 (dd, *J* = 14.98 Hz, *J* = 6.72 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-); 3.18 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.25 (bd, *J* = 14.37 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-); 4.18-4.21 (m, 1H, -OH); 4.66 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.17-7.22 (m, 3H, H_{Ar}); 7.58 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.68-7.72 (m, 3H, H_{Ar}); 8.59 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.5; 21.6; 22.7; 26.1; 39.8; 44.0; 69.0; 120.9; 122.3; 127.0; 128.0; 137.1; 138.1; 138.5; 149.2; 156.9; 163.4. Anal. (C₂₃H₂₆N₆OS) C, H, N.

5-(3-Hydroxy-2-butyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.4**):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol) a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán E/Z-2,3-epoxybutan (130 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 h. Produkt precipitoval po přidání vody a byl dále vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 1%, 2%, and 3% MeOH v CHCl₃. Produkt byl nakonec získán krystalizací z DCM/Et₂O, 0.25 g, ve výtěžku 54%, b.t. 168-172°C. MS ESI + 449.2 (M + H)⁺, ESI - 447.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.29-1.26 (m, 6H, -CH-(CH₃)₂); 1.33 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, -CH-CH₃); 1.43 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, -CH-CH₃); 3.21-3.26 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.52 - 3.55 (m, 1H, -CH-CH₃); 3.89 - 3.92 (m, 1H, -CH-CH₃); 4.73 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.23-7.21 (m, 1H, H_{Ar}); 7.26 - 7.28 (m, 2H, H_{Ar}); 7.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.73 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.76 - 7.78 (m, 3H, H_{Ar} + NH-CH₂-); 8.64 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆) δ 17.5, 21.43, 21.46, 21.7, 26.1, 44.0, 48.3, 71.9, 120.1, 122.0, 126.8, 128.3, 136.6, 138.3, 138.6, 149.3, 156.3, 161.8.

5-(1-Hydroxy-2-butyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.5**):

Prekursor syntézy 2-bromo-1-butanol byl připraven z 2-bromobutanové kyseliny, která byla redukována zaváděním plynného B₂H₆ do THF roztoku, při -10°C, po dobu 5h a pak při 0°C 5h a nakonec při laboratorní teplotě ještě 2h. Reakce byla přerušena přikapáním vodného 50% roztoku HCOOH za míchání. Směs byla zahuštěna odparem za laboratorní teploty a tlaku 15 torr. Zbytek byl neutralizován vodným roztokem NaHCO₃ do konce vývoje CO₂. Produkt byl extrahován EtOAc a vysušen MgSO₄. Z extraktu byly těkavé složky odstraněny tři laboratorní teplotě a tlaku 15 torr. Tento surový produkt (ρ = 1.38 g/mL) byl použit k následné alkyliaci.

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.225 g, 0.66 mmol) v DMSO (5 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.2 g) a 2-bromo-1-butanol (120 μL, 1.0 mmol) a směs byla míchána 48 h při lab. teplotě. DMSO byl odpařen při tlaku 0.4 torr a destilační zbytek byl extrahován mezi CHCl₃ and H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny MgSO₄ a zahuštěny ve vakuu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% a 4% MeOH v CHCl₃. Nakonec byl produkt vykrytalován z abs. Et₂O, 0.070 g, ve výtěžku 22%, b.t. 126 - 129 °C. MS ESI + 449.1 (M + H)⁺, ESI - 447.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, -CH₃); 1.34 - 1.38 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.54 - 1.62 (m, 1H, -CH_αH_β-CH₃); 1.80-1.87 (m, 1H, -CH_αH_β-CH₃); 3.23 (m, *J* = 6.9 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.50 - 3.52 (m, 1H, -S-CH-); 3.70 - 3.74 (m, 2H, -CH₂-OH); 4.76 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, NH-CH₂-); 4.86 (bs, 1H, -OH), 7.32-7.34 (m, 1H, H_{Ar}); 7.44 - 7.51 (m, 2H, H_{Ar}); 7.84 - 7.94 (m, 2H, H_{Ar}); 8.00 - 8.08 (m, 3H, H_{Ar} + -NH); 8.64 - 8.65 (m, 1H, H_{Ar}); 12.16 (s, 1H, -NH). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.3, 21.5, 21.6, 21.7, 23.5, 24.9, 26.3, 40.4, 43.1, 48.4, 63.0, 120.0, 120.3, 122.3, 122.5, 126.3, 126.6, 127.6, 128.0, 130.4, 137.1, 137.6, 138.6, 139.5, 139.9, 140.5, 148.5, 148.7, 149.4, 153.7, 155.6, 155.8, 161.0. Anal. (C₂₄H₂₈N₆OS) C, H, N.

5-(2-Carbamoyl-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.6**):

55

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (200 mg, 0.54 mmol) v DMF (6 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.2 g) a 3-chloropropionamid (65 mg, 0.6 mmol) a reakční směs byla míchána 8 h při 50 °C. Směs byla zahuštěna odpařením při teplotě do 50 °C a zbytek byl vyextrahován mezi EtOAc and H₂O. Spojené organické faze byly vysušeny Na₂SO₄ a produkt byl získán krystalizací z EtOAc, 0.11 g, ve výtěžku 46%, b.t. 137 - 140 °C: MS ESI + 448.2 (M + H)⁺ 100%, 470.2 (M + Na)⁺ 30%, ESI - 446.3 (M - H)⁻ 100%, 893.3 (2M - H)⁻ 30%. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.50 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H, O=C-CH₂-); 3.20 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H, -S-CH₂-); 3.26 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.75 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.78 (bs, 1H, -C(O)-NH_αH_β); 7.26 (bs, 1H, -C(O)-NH_αH_β); 7.31 (qd, *J* = 7.41 Hz, *J* = 4.74 Hz, *J* = 1.22 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.84 (td, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.04 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.46 (bs, 1H, -NH-); 8.63 (bd, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.6; 26.0; 35.2; 42.9; 120.0; 122.4; 125.3; 126.5; 127.8; 131.9; 137.1; 137.4; 139.9; 149.4; 155.7; 160.4; 172.7. Anal. (C₂₃H₂₅N₇OS) C, H, N.

5-(Carbamoylmethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.7.**)

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (200 mg, 0.54 mmol) v DMF (6 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.09 g) and 2-chloroacetamid (51 mg, 0.54 mmol) a reakční směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě. Po zahuštění odpařením při teplotě do 50°C byl přidavkem vody získán vykrystalovaný produkt, 0.13 g, ve výtěžku 56%, b.t. 220 - 235 °C. MS ESI + 434.2 (M + H)⁺, ESI - 432.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.35 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.26 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.72 (s, 2H, -S-CH₂-); 4.76 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.02 (bs, 1H, -C(O)-NH_αH_β); 7.31 (qd, *J* = 6.42 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.42 (bs, 1H, -C(O)-NH_αH_β); 7.50 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.85 (td, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.92 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.05 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.34 (bs, 1H, -NH-); 8.64 (bd, *J* = 4.28 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.6; 25.8; 34.4; 42.9; 120.0; 122.4; 126.5; 128.0; 137.0; 137.5; 139.8; 149.4; 155.7; 160.1; 170.3. Anal. (C₂₂H₂₃N₇OS) C, H, N.

5-(3-Hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.8.**)

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (200 mg, 0.54 mmol) v DMF (6 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.1 g) a 3-bromopropanol (54 μL, 0.6 mmol) a reakční směs byla míchána 3 h při lab. teplotě. Směs byla zahuštěna odpařením při teplotě do 50 °C a zbytek byl vyextrahován mezi CHCl₃ a H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny ve vakuu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 2%, 3% and 4% MeOH v CHCl₃ a krystalizací z CHCl₃/Et₂O bylo získáno, 0.15 g produktu, ve výtěžku 66%, b.t. 150 - 152 °C: MS ESI + 435.2 (M + H)⁺, ESI - 433.3 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃ + DMSO-*d*₆): 1.20 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.72 - 1.74 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 3.13 (t, *J* = 5.50 Hz, 2H, -S-CH₂-); 3.18 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.49 - 3.50 (m, 2H, -CH₂-OH); 4.61 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 4.75 (bs, 1H, -OH); 7.03 - 7.06 (m, 1H, H_{Ar}); 7.30 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.50 - 7.58 (m, 3H, H_{Ar} + -NH-CH₂-); 7.79 (d, *J* = 7.03 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.46 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, H_{Ar}); 11.64 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; CDCl₃ + DMSO-*d*₆): 21.3; 25.7; 26.4; 32.6; 43.7; 58.5; 119.9; 121.8; 126.6; 128.2; 136.4; 138.2; 138.6; 149.1; 156.1; 162.5. Anal. (C₂₃H₂₆N₆OS) C, H, N.

5-(2-Amino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.9.**)

a) K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (1.0 g, 2.66 mmol) a 3.1 mL 48% HBr v DMF (20 mL) byl za laboratorní teploty přikápan aziridin (0.42 mL, 8 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h:

byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na₂CO₃ a surový produkt byl vyzolován ve formě precipitátu.

b) K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (1 g, 2.66 mmol) v DMF (30 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.5 g) a 2-(Boc-amino)ethylbromid (0.61 g, 2.71 mmol), reakční směs byla míchána 16 h při laboratorní teplotě. Surový produkt reakce byl izolován ve formě precipitátu po přidání vody. Precipitát byl rozpuštěn v 25 ml 2N aq. HCl a debocylace probíhala přes noc při laboratorní teplotě. Reakční směs byla neutralizována vodným roztokem Na₂CO₃ a surový produkt byl izolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.72 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 65% v př. procesu a) a 0.75 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 67% v př. procesu b). MS ESI + 420.2 (M + H)⁺ 100%, 839.3 (2M + H)⁺ 15% , ESI - 418.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.89 (t, *J* = 6.72 Hz, 2H, NH₂-CH₂-); 3.12 (t, *J* = 6.72 Hz, 2H, -CH₂-S-); 3.27 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.76 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.31 (qd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.84 (td, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.91 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.05 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.45 (bt, *J* = 5.81 Hz, 1H, -NH-CH₂-); 8.63 (qd, *J* = 4.74 Hz, *J* = 1.53 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.6; 25.8; 32.7; 40.8; 42.9; 120.0; 122.4; 126.5; 127.8; 137.0; 137.4; 138.5; 139.9; 149.4; 155.7; 160.3. Anal. (C₂₂H₂₅N₇S) C, H, N.

5-(2-Guanidino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.10**.)

K roztoku 5-(2-amino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3- d]pyrimidine **4.9**. (0.35 g, 0.84 mmol) a DIEA (0.30 mL, 1.7 mmol) v DMF (2 mL) byl přidán 1H- pyrazole-1-carboxamide (0.143 g HCl soli, 0.95 mmol) a reakční směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě. Po zahuštění odpařením při teplotě do 50 °C byl odparek vyextrahován mezi CHCl₃ a H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂CO₃ a odpařeny ve vakuu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě 10%, 12% and 14% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po odpaření ve vakuu bylo získáno: 0.225 g, amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 58%. MS ESI + 231.7 (M + 2H)²⁺ 100%, 462.1 (M + H)⁺ 30% , ESI - 460.1 (M - H)⁻. NMR: směs dvou tautomerů: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.34 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂), 3.15 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-), 3.24 (sept., *J* = 6.9 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂), 3.36 (s, 2H), 3.42-3.46 (m, 2H, -CH₂-CH₂-), 4.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, NH-CH₂-), 7.32 (dd, *J* = 7.0, 5.2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.45 (s, 1H, H_{Ar}), 7.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.83-7.87 (m, 2H, H_{Ar}), 7.93 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 8.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_{Ar}), 8.64 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.93 (s, 1H, -NH), 13.05 (s, 1H, - NH). ¹³C (125 MHz, DMSO- *d*₆) δ 21.76, 26.30, 29.43, 40.56, 42.96, 48.59, 120.13, 120.77, 122.52, 126.58, 127.66, 127.82, 137.22, 137.51, 139.70, 139.83, 148.46, 148.94, 149.51, 155.77, 156.95, 159.73. Anal. (C₂₃H₂₇N₉S) C, H, N.

5-(2-Ureido-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.11**.)

K roztoku 5-(2-amino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3- d]pyrimidinu **4.9**. (0.35 g, 0.84 mmol) v AcOH (6 mL) byl postupně přikapán vodný roztok kyanátu draselného (0.13 g, 1.6 mmol) v 1 mL vody a reakční směs byla míchána 4 h při laboratorní teplotě. Po zahuštění odpařením při teplotě do 50 °C byl odparek vyextrahován mezi CHCl₃ and H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny ve vakuu. Produkt by vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃. Po odpaření ve vakuu bylo získáno: 0.12 g, amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 31%. MS ESI + 232.5 (M + 2H)²⁺ 100%, 463.1 (M + H)⁺ 60% , ESI - 461.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂), 3.03 - 3.08 (m, 2H, -CH₂-CH₂-),

3.22 - 3.29 (m, 3H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2 + -\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-$), 4.77 (s, 2H, $\text{NH}-\underline{CH}_2-$), 5.48 (s, 2H, $-\text{NH}_2$), 6.15 (s, 1H, $-\text{NH}$), 7.31 - 7.32 (m, 1H, H_{Ar}), 7.50 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.92 - 7.94 (m, 1H, H_{Ar}), 8.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H_{Ar}), 8.64 (s, 1H, H_{Ar}), 12.20 (s, 1H, $-\text{NH}$). ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 21.70, 26.35, 31.07, 35.78, 43.19, 62.79, 79.18, 120.14, 122.57, 126.67, 128.10, 137.23, 139.67, 148.83, 149.52, 155.73, 158.54, 160.43. Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{OS}$) C, H, N.

5-(2-Acetylamino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.12.)

Byl izolován sloupcovou chromatografií jako vedlejší produkt syntézy 5-(2-ureido-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu **4.11.** ve formě amorfní tuhé bezbarvé pěny, 0.08 g, ve výtěžku 20 %. MS ESI + 232.5 ($\text{M} + 2\text{H}$)²⁺ 100%, 463.1 ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 60%, ESI - 461.1 ($\text{M} - \text{H}$)⁻. NMR: směs dvou tautomerů: ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.37 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$), 1.79-1.78 (m, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.19 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $-\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-$), 3.32 (sept, $J = 7.0$ Hz, 1H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$), 3.49 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, $-\underline{CH}_2-\underline{CH}_2-$), 4.73 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H, $\text{NH}-\underline{CH}_2-$), 7.10 (bs, 1H, $-\text{NH}$), 7.22-7.19 (m, 1H, H_{Ar}), 7.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{Ar}), 7.74-7.71 (m, 1H, H_{Ar}), 7.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_{Ar}), 8.62 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H_{Ar}). ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 21.83, 23.13, 26.35, 30.31, 40.56, 44.29, 120.74, 122.33, 127.13, 128.17, 137.18, 138.25, 138.86, 147.35, 149.33, 150.18, 156.76, 161.81, 171.31.

5-(2-Amino-2-methyl-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.13.)

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (3.8 g, 10 mmol), 3 mL 48% HBr, DMF (3 mL) a H_2O (10 mL) byl za laboratorní teploty přikápan 2,2-dimethylaziridin (1.5 mL, 20 mmol, syntetizovaný dle Org. Synth. 1955 Coll. vol. 3, p. 148.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h, pak byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na_2CO_3 a surový product byl vyizolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl_3 s malým množstvím aq. NH_4OH . Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 1,6 g amorfní bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 36%. MS ESI + 448.2 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, ESI - 446.2 ($\text{M} - \text{H}$)⁻. NMR: ^1H (500 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): 1.24 (s, 6H, 2x $-\text{CH}_3$); 1.29 (d, $J = 7.03$ Hz, 6H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$); 3.43 (t, $J = 6.11$ Hz, 1H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$); 3.60 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$); 4.97 (d, $J = 5.20$ Hz, 2H, $-\text{NH}-\underline{CH}_2-$); 7.62 (d, $J = 8.56$ Hz, 2H, ArH); 7.76 (t, $J = 6.42$ Hz, 1H, ArH); 8.05 (d, $J = 8.56$ Hz, 2H, ArH); 8.24 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H, ArH); 8.36 (t, $J = 7.49$ Hz, 1H, ArH); 8.49 (bs, 2H, $-\text{NH}_2$); 8.76 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, ArH). ^{13}C (125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$): 22.3; 25.0; 25.7; 31.2; 34.5; 39.2; 44.0; 49.2; 54.4; 124.3; 125.1; 128.5; 128.7; 132.5; 141.9; 144.1; 144.9; 152.9; 160.2. Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{S}$) C, H, N.

5-(2-Hydroxycyclohex-1-yl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.14.)

K míchané suspenzi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol) a tetramethylamonium hydroxidu (katalytické množství, 80 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán 1,2-epoxycyclohexan (0.12 mL, 1.15 mmol) v MeOH (2 mL) a směs byla míchána 7 h při 40°C. Směs byla zahuštěna odpařením při teplotě do 50 °C a zbytek byl vyextrahován mezi 2- methyltetrahydrofuran a H_2O . Spojené organické fáze byly vysušeny Na_2SO_4 a zahuštěny ve vakuu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 2%, 3% and 4% MeOH v CHCl_3 a odpařením rozpoštědel bylo získáno, 0.22 g amorfní bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 46%. MS ESI + 475.1 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, ESI - 473.1 ($\text{M} - \text{H}$)⁻. NMR: ^1H (500 MHz; CDCl_3): 1.17 (d, $J = 7,03$ Hz, 3H, $-\underline{CH}_3$); 1.19 - 1.20 (m, 2H, $-\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\underline{CH}_2-\text{CH}-\text{S}- + -\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\underline{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$); 1.23 (d, $J = 7,03$ Hz, 3H, $-\underline{CH}_3$); 1.31 - 1.39 (m, 2H, $-\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\text{CH}-\text{S}- + -\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\text{CH}-\text{OH}$); 1.67 - 1.69 (m, 2H, $-\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\underline{CH}_2-\text{CH}-\text{S}- + -\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\underline{CH}_2-\text{CH}-\text{OH}$); 2.06 - 2.16 (m, 2H, $-\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\text{CH}-\text{S}- + -\underline{CH}_\alpha\text{H}_\beta-\text{CH}-\text{OH}$); 3.17 (sept., 1H, $-\underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$); 3.40 - 3.46

(m, 1H, -S-CH₂-); 3.54 (td, *J* = 10.70 Hz, *J* = 4.26 Hz, 1H, -CH-OH); 4.64 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.15 - 7.19 (m, 3H, H_{Ar}); 7.31 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.57 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.66 - 7.70 (m, 3H, H_{Ar}); 8.57 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.3; 21.7; 24.0; 26.0; 26.2; 30.2; 31.5; 36.5; 44.0; 51.2; 77.4; 120.8; 121.1; 127.0; 127.9; 136.9; 138.2; 138.6; 149.3; 157.0; 163.6. Anal. (C₂₆H₃₀N₆OS) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-1-butyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.15.)

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 60 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán 1,2-epoxybutan (0.1 mL, 1.15 mmol) v MeOH (2 mL) a reakční směs byla míchána 10 h při laboratorní teplotě. Produkt precipitoval přidáním vody a byl dále vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 1%, 2%, and 3% MeOH v CHCl₃. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno 0.28 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 62%. MS ESI + 449.2 (M + H)⁺ 20%, 471.3 (M + Na)⁺ 100%, ESI - 447.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 0.88 (t, *J* = 7.34 Hz, 3H, -CH₃); 1.18 (d, *J* = 5.83 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.51 - 1.63 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₃); 3.07 (dd, *J* = 14.98 Hz, *J* = 7.03, 1H, -S-CH_αH_βCH-); 3.16 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.25 (d, *J* = 14.67 Hz, 1H, -S-CH_αH_βCH-); 3.86 - 3.91 (m, 1H, -CH-OH); 4.63 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.14 - 7.18 (m, 3H, H_{Ar}); 7.56 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.65 - 7.69 (m, 3H, H_{Ar}); 8.55 (d, *J* = 3.67 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 9.8; 21.4; 21.5; 26.1; 29.4; 37.6; 44.0; 74.3; 120.9; 122.2; 127.0; 127.9; 137.0; 138.1; 138.5; 149.2; 156.9; 163.5. Anal. (C₂₄H₂₈N₆OS) C, H, N.

5-(2-Hydroxycyclopent-1-yl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.16.)

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 80 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán 1,2-epoxycyclopentan (0.10 mL, 1.15 mmol) v MeOH (2 mL) a směs byla míchána 7 h při 40°C. Reakční směs byla zahuštěna při teplotě do 50 °C a odparek byl vyextrahován mezi 2- methyltetrahydrofuran a H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂SO₄ a zahuštěny ve vakuu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 2%, 3% and 4% MeOH v CHCl₃. Produkt vykristaloval z CHCl₃, 0.25 g, ve výtěžku 54%, b.t. 148 - 150 °C. MS ESI + 461.1 (M + H)⁺, ESI - 459.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.42 (d, *J* = 6.42 Hz, 3H, -CH₃); 1.19 (d, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH₃); 1.44 - 1.51 (m, 1H, -S-CH-CH_αH_β-); 1.62 - 1.75 (m, 3H, -CH₂-CH₂-CH₂- + HO-CH-CH_αH_β-); 2.01 - 2.10 (m, 2H, -S-CH-CH_αH_β- + HO-CH-CH_αH_β-); 3.15 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.58 - 3.63 (m, 1H, -S-CH-CH₂); 4.18 - 4.22 (m, 1H, HO-CH-CH₂-); 4.65 (bs, 2H, NH-CH₂-); 5.01 (dd, *J* = 9.78 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, CH_αH_β=CH-); 5.22 (dd, *J* = 16.96 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, CH_αH_β=CH-); 7.16 - 7.24 (m, 3H, H_{Ar}); 7.58 - 7.59 (m, 1H, H_{Ar}); 7.67 - 7.72 (m, 3H, H_{Ar}); 8.56 (bs, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.3; 21.8; 22.7; 25.8; 29.7; 34.4; 44.2; 50.6; 82.7; 120.8; 122.3; 127.1; 128.2; 137.1; 138.3; 138.4; 149.3; 156.8; 164.4. Anal. (C₂₅H₂₈N₆OS) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-2-methyl-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.17.)

a) K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol) v DMSO (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.6 g) a 1-chloro-2-methylpropan-2-ol (155 μL, 1.5 mmol) a směs byla míchána 48 h při laboratorní teplotě. Po zahuštění při teplotě do 50°C byl odparek vytřepán mezi CHCl₃ a H₂O. Surový produkt byl získán zahuštěním spojených vysušených Na₂SO₄ organických fází.

b) K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v

MeOH (6 mL) byl přidán 1,2-epoxy-2,2-dimethylpropan (0.12 mL, 1.3 mmol) v 2 mL MeOH a směs byla míchána 7 h při laboratorní teplotě. Surový produkt byl získán ve formě precipitátu po přidání vody. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 2%, 3% and 4% MeOH v CHCl₃. Odpařením rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé tuhé pěny v případě postupu a) 0.24 g, výtěžek 54% a v př. postupu b) 0.28 g, výtěžek 62%. MS ESI + 449.1 (M + H)⁺, ESI - 447.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): směs dvou tautomerních forem, 1.35 - 1.38 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.21 - 3.27 (m, 4H, -CH(CH₃)₂, -CH₃); 4.69 - 4.80 (m, 2H, NH-CH₂-); 5.29 - 5.34 (m, 2H, -S-CH₂-); 7.31 - 7.33 (m, 1H, H_{Ar}); 7.45 - 7.52 (m, 2H, H_{Ar}); 7.83 - 7.86 (m, 1H, H_{Ar}); 7.88 - 7.93 (m, 1H, H_{Ar}); 8.00 - 8.08 (m, 2H, H_{Ar}); 8.63 - 8.64 (m, 1H, H_{Ar}); 12.21 (bs, -NH-, form I); 13.79 (bs, -NH-, form II). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.5; 21.7; 24.8; 26.2; 42.5; 43.2; 55.9; 73.3; 120.0 120.6; 122.3; 122.4; 126.3; 126.6; 127.6; 128.0; 137.1; 137.7; 139.4; 139.8; 148.7; 148.9; 149.4; 153.9; 155.6; 155.8; 159.2. Anal. (C₂₄H₂₈N₆OS) C, H, N.

15 *5-(2,3-Dihydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.18.)*

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38g, 1 mmol) v DMF (3 mL) a tetramethylamonium hydroxidu (0.11 g) byl přidán 3-chloro-1,2- propandiol (127 μL, 1.5 mmol) a směs byla míchána 24 h při lab. teplotě. Surový produkt precipitoval přidavkem vody a byl pak vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% , 4% a 5% MeOH v CHCl₃. Amorfni bezbarvá tuhá pěna produktu 0.24 g, byla získána ve výtěžku 54%. MS ESI + 451.1 (M + H)⁺ 100%, 473.2 (M + Na)⁺ 30% , ESI - 449.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.30 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.22 - 3.30 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂-); 3.57 (dd, 1H, *J* = 11.62 Hz, *J* = 4.89 Hz, -CH_αH_β-); 3.63 (dd, 1H, *J* = 11.62 Hz, *J* = 4.89 Hz, -CH_αH_β-); 3.95 (pent., *J* = 5.20 Hz, 1H, -CH-); 4.69 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.21 (dd, *J* = 7.03 Hz, *J* = 5.20 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.33 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.61 (d, *J* = 7.03 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.72 (d, *J* = 7.34 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.75 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.56 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.4; 21.5; 25.9; 34.1; 44.1; 64.4; 72.5; 121.1; 122.3; 127.2; 128.3; 137.3; 138.3; 138.6; 149.2; 157.0; 163.4. Anal. (C₂₃H₂₆N₆O₂S) C, H, N.

5-[2-(Dimethylamino)-1-ethyl]thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.19.)

35 K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38g, 1 mmol) v DMF (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.6 g), 2-chloro-N,N-dimethylethylamin hydrochlorid (166 mg, 1.15 mmol) a směs byla míchána 24 h při teplotě 60 °C. Reakční směs byla zahuštěna při teplotě do 50°C a odparek byl vyextrahován mezi CHCl₃ and H₂O. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 5%, 8% a 10% MeOH v CHCl₃. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé tuhé pěny, 0.30 g, ve výtěžku 67%. MS ESI + 224.5 (M + 2H)²⁺ 70%, 448.1 (M + H)⁺ 100%, ESI - 446.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.31 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.23 (s, 6H, 2x -CH₃); 2.65 (t, *J* = 7.64 Hz, 2H, -CH₂-); 3.20 (t, *J* = 7.34, 2H, -CH₂-); 3.27 (kvint.; *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.61 (bs, 2H, -NH- CH₂-); 6.97 (bs, 1H, -NH-CH-); 7.14 - 7.18 (m, 3H, ArH); 7.55 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, ArH); 7.66 (dd, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.69 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 8.55 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.8; 26.4; 28.1; 44.0; 45.1; 59.1; 120.9; 122.3; 127.1; 128.0; 137.2; 138.2; 139.1; 149.4; 150.7; 157.0; 161.7. Anal. (C₂₄H₂₉N₇S) C, H, N.

50 *5[3-(Dimethylamino)-1-propyl]thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.20.):*

55 K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38g, 1 mmol) v DMF (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.6 g) a 3-chloro-N,N-dimethylpropylamin hydrochlorid (182 mg, 1.15 mmol) a směs byla míchána 24 h při teplotě 60 °C. Reakční

směs byla zahuštěna při teplotě do 50 °C a odparek byl roztřepán mezi CHCl₃ and H₂O. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 5%, 8% a 10% MeOH v CHCl₃. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé tuhé pěny, 0.33 g, ve výtěžku 72%. MS ESI + 231.6 (M + 2H)²⁺ + 50%, 462.1 (M + H)⁺ + 100%, ESI - 460.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.32 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 190 (pent., *J* = 7.03 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 2.20 (s, 6H, -N(CH₃)₂); 2.43 (t, *J* = 7.34 Hz, 2H, -CH₂-); 3.07 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H, -CH₂-); 3.28 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.66 (bs, 2H, NH-CH₂-); 6.86 (bs, 1H, -NH-); 7.16 - 7.19 (m, 1H, H_{Ar}); 7.25 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.59 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.67 - 7.70 (m, 1H, H_{Ar}); 7.75 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.59 (d, *J* = 3.97 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.7; 26.2; 27.4; 28.9; 29.6; 43.9; 45.1; 58.5; 120.8; 122.2; 127.0; 127.9; 137.0; 138.0; 139.0; 149.3; 150.6; 156.9; 162.0. Anal. (C₂₅H₃₁N₇S) C, H, N.

5-(1-Hydroxy-3-methyl-2-butyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.21.)

Prekurzor 2-bromo-3-methyl-1-butanol byl získán z 3-methylbutenalu, který byl nejprve bromován brom-dioxanovým komplexem (1:1) dle lit. (J. Label. Comp. Radiopharm. 2007, 50, 225). Vzniklý 2-bromo-3-methylbutanal byl pak redukován obvyklým postupem s použitím NaBH₄ na 2-bromo-3-methyl-1-butanol a vzniklý surový produkt byl použit k alkylaci.

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38g, 1 mmol) v MeOH (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.16 g) a 2-brom-3-methyl-1-butanol (0.25 g, 1.5 mmol). Reakční směs byla míchána 24 h při 50°C a pak byla zahuštěna při teplotě do 50°C. Odparek byl vytřepán mezi CHCl₃ a H₂O, spojené organické fáze byly vysušeny MgSO₄ a odpařeny do sucha. Produkt byl pak vyčištěn sloupcovou chromatografií postupně v soustavě: 2%, 3% a 4% MeOH in CHCl₃. Po zahuštění odpařením ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny 0.31 g, ve výtěžku 67%. MS ESI + 463.1 (M + H)⁺, ESI - 461.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 0.90 (d, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH₃); 0.96 (d, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH₃); 1.21 (d, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH₃); 1.23 (d, *J* = 7.03 Hz, 3H, -CH₃); 1.82 (sex., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH-CH(CH₃)₂); 3.13 - 3.26 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂-); 3.66 - 3.69 (m, 1H, -CH-); 4.67 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.03 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.13 - 7.21 (m, 3H, H_{Ar}); 7.60 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.69 (dd, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.72 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.58 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}), 11.9 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 18.0; 18.3; 21.4; 21.6; 26.1; 33.5; 35.7; 44.1; 78.4; 120.9; 122.2; 127.1; 128.0; 137.0; 138.3; 138.6; 149.3; 157.0; 163.7. Anal. (C₂₅H₃₀N₆OS) C, H, N.

5-β-D-Thioglukosid-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.22.):

K suspenzi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38g, 1 mmol) v MeOH (20 mL) byl přidán CH₃ONa (60 mg, 1.1 mmol) a 1-bromo-α-D-glukosa tetraacetát (0.42 g, 1.0 mmol). Reakční směs byla míchána 9 dní při laboratorní teplotě. Byl přidán 1 mL vody a směs byla míchána další 1 h. Surový produkt vykristaloval po zahuštění reakční směsi za sníženého tlaku. Čištění sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 8%, 10% and 13% MeOH in CHCl₃ poskytlo ochotně krystalující (z MeOH) produkt 0.48 g, ve výtěžku 88%, b.t. 225 - 227 °C. α_D = - 29.6°, (c = 1.37 g/100mL DMSO, 22°C). MS ESI + 561.2 (M + Na)⁺, ESI - 537.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.35 - 1.39 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.15 - 3.26 (m, 5H, -CH(CH₃)₂, 4 x -CH-); 3.42 - 3.46 (m, 1H, -CH-CH₂H_β-OH); 3.54 - 3.57 (m, 1H, -CH-CH₂H_β-OH); 4.35 - 4.39 (m, 1H, -OH); 4.72 - 4.80 (m, 2H, NH-CH₂-); 4.88 - 4.89 (m, 1H, -OH); 5.01 - 5.03 (m, 1H, -OH); 5.21 - 5.24 (m, 1H, -OH); 5.39 - 5.43 (m, 1H, -CH-); 7.31 - 7.33 (m, 1H, H_{Ar}); 7.44 - 7.51 (m, 2H, H_{Ar}); 7.83 - 7.93 (m, 2H, H_{Ar}); 8.00 - 8.08 (m, 3H, H_{Ar} + NH-CH₂- form I); 8.64 - 8.65 (m, 1H, H_{Ar}); 8.70 (bs, 1H, NH-CH₂- form II); 12.17 (bs, 1H, -NH-, form I); 13.75 (bs, -NH-, form II). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): mixture of two forms 21.4; 21.6; 21.7; 25.0; 26.4; 42.5; 43.1; 60.4; 69.5; 71.8; 78.7; 81.1; 81.2; 85.0; 120.0; 120.1; 120.5; 122.3; 122.4; 126.3; 126.6; 127.6; 128.0; 130.6; 135.2; 137.1; 137.2; 137.7; 138.8;

139.5; 140.0; 140.5; 148.6; 148.9; 149.4; 153.9; 155.7; 155.8; 159.5; 159.6. Anal. (C₂₆H₃₀N₆O₅S) C, H, N.

5-*(R/S)*-(3-Amino-2-hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin *a* (*R*)-antipod (**4.23**)

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol) v MeOH (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.17 g) a 3-benzylidenamino-1-chloropropan-2-ol (0.22 g, 1.3 mmol; *R/S* nebo *R* připravený z *R/S* nebo *R* - epichlorhydrinu podle literatury: Org. Proc. Res. Develop., 2003, No 7, 539) a směs byla míchána 24 h při 40 °C. Reakční směs byla okyselena konc. aq. HCl a byla míchána 5 h při 45 °C. Surový produkt byl získán po zahuštění ve vakuu při teplotě do 50°C, zalkalizování přidáním roztoku 1 g Na₂CO₃ v 10 ml vody, a vykrystalováním v ledničce z tohoto vodného roztoku. Vyčistění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 5%, 8% and 10% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Konečná krystalizace z MeOH pak dala 0.30 g produktu, ve výtěžku 67%, b.t. 124 – 128 °C, (*R/S*)-antipode; b.t. 120 - 125 °C, (*R*)-antipode. MS ESI + 450.1 (M + H)⁺ 100%, 472.1 (M + Na)⁺ 20%, ESI - 448.1 (M - H)⁻, 484.1 (M + Cl)⁻ 40%, α_D = - 4.8°, (c = 1.37 g/100mL, DMSO, 22°C). NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.38 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.67 (dd, *J* = 13.14 Hz, *J* = 7.64 Hz, 1H, NH₂-CH_αH_β-CH); 2.81 (dd, *J* = 13.14 Hz, *J* = 3.67 Hz, 1H, NH₂-CH_αH_β-CH); 3.21 (dd, *J* = 14.37 Hz, *J* = 6.42 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-CH); 3.29 (dd, *J* = 14.37 Hz, *J* = 5.50 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-CH); 3.36 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.85 - 3.90 (m, 1H, -CH₂-CH-CH₂-); 4.82 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.28-7.31 (qd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 5.04 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.76 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.82 (td, *J* = 7.49 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.86 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.55 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 22.2; 27.0; 36.1; 44.8; 46.7; 72.7; 122.5; 123.7; 128.3; 128.4; 129.1; 138.9; 139.1; 139.4; 141.0; 150.2; 158.5; 163.9. Anal. (C₂₃H₂₇N₇OS) C, H, N.

5-[(3-(4-Morpholinyl)-2-hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**4.24**):

K roztoku of 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-thiolu **3.1**. (0.38 g, 1 mmol) v MeOH (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.34 g) a 1-chloro-3-morpholinopropan-2-ol hydrochlorid (0.20 g, 1.2 mmol; připravený podle lit.: Russ. J. Org. Chem. 2006, 42,1845) a reakční směs byla míchána 24 h při 45 °C. Surový produkt precipitoval po přidání vody a pak byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 3%, 4% and 5% MeOH in CHCl₃. Zahuštěním ve vakuu byl získán produkt 0.31 g, ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, ve výtěžku 60%. MS ESI + 520.1 (M + H)⁺ 15%, 542.1 (M + Na)⁺ 100%, ESI - 518.1 (M - H)⁻ 30%, 554.2 (M + Cl)⁻ 100%. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.17 - 1.22 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.30 - 2.33 (m, 3H, -CH-CH_αH_β-N- + -N-(CH_αH_β)₂-); 2.41 - 2.43 (m, 2H, -N-(CH_αH_β)₂-); 2.52 (dd, *J* = 12.53 Hz, *J* = 8.56 Hz, 1H, -CH-CH_αH_β-N); 3.09 - 3.18 (m, 2H, -CH(CH₃)₂ + S-CH_αH_β-CH-); 3.27 (d, *J* = 12.53 Hz, 1H, S-CH_αH_β-CH-); 3.49 (bs, 4H, O-(CH₂)₂-); 4.07 - 4.09 (m, 1H, -CH₂-CH-CH₂-); 4.64 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.16 (dd, *J* = 7.18 Hz, *J* = 5.20 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.21 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.40 (bs, 1H, -NH-); 7.58 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.67 (td, *J* = 7.79 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.72 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.57 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.5; 21.6; 26.1; 36.3; 44.2; 53.8; 63.8; 66.5; 68.5; 120.7; 122.2; 127.0; 128.1; 137.0; 138.3; 138.5; 149.4; 156.8; 162.9. Anal. (C₂₇H₃₃N₇O₂S) C, H, N.

5-[3-(1-Piperazinyl)-2-hydroxy-1-propyl]thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**4.25**):

Nejprve byl připraven 3-(4-Boc-piperazin-1-yl)-1,2-epoxypropan reakcí eqvimolárního množství epichlorhydrinu s N-Boc-piperazinem v acetonitrilu s K₂CO₃ (2 mmol). Reakční směs byla míchána 2 dny při teplotě 10 °C. Surový produkt (dále použitý v reakci) byl získán filtrací a zahuštěním ve vakuu 10 torr při 45 °C.

Směs 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (380 mg, 1 mmol), tetramethylamonium hydroxidu (0.2 mL, 25% roztok v MeOH), triethylaminu (0.2 mL, 2.2 mmol) a 3-(4-Boc-piperazin-1-yl)-1,2-epoxypropanu (0.45 g, 1.8 mmol) v 5 mL MeOH byl míchan 2 dni při laboratorní teplotě. Bocylovaný produkt byl izolován vysrážením vodou. Precipitát byl rozpuštěn v 3 mL TFA a stál při lab. teplotě 2 h. Roztok byl zahuštěn ve vakuu (teplota do 50°C) a produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 5%, 8% a 10% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Zahuštěním ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny 0.25 g, ve výtěžku 48%. MS ESI + 519.1 (M + H)⁺, ESI - 517.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.35 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-CH₃); 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-CH₃); 2.31 - 2.40 (m, 6H, N-CH₂-CH-OH + 2 x -CH₂-); 2.76 - 2.77 (m, 4H, 2 x -CH₂-); 3.00 (dd, *J* = 13.45 Hz, *J* = 7.03 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-); 3.25 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.34 (dd, *J* = 13.60 Hz, *J* = 4.58 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-); 3.88 (m, 1H, -CH₂-CH-OH); 4.76 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.32 (qd, *J* = 7.41 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 1.22 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.80 (td, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.92 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.05 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.32 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 8.64 (qd, *J* = 4.86 Hz, *J* = 1.83 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 12.77 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.6; 21.7; 25.7; 36.0; 42.9; 44.6; 53.1; 63.8; 67.2; 120.0; 122.4; 126.5; 127.8; 137.4; 138.2; 139.8; 149.4; 150.2; 155.7; 157.9; 161.2. Anal. (C₂₇H₃₄N₈OS) C, H, N.

5-[2-(1-Imidazolyl)-1-ethyl]thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.26.**):

Nejprve byl připraven N-(2-chlorethyl)imidazol mícháním sodné sole imidazolu (20g) v 1,2-dichloroethanu (80 mL) při lab. teplotě 3 dni. Po přidání vody byl produkt vyextrahován 1,2-dichloroethanem. Surový produkt (použitý dale v syntéze) byl získán zahuštěním ve vakuu.

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 mg, 1 mmol) v DMF (8 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.2 g) a N-(2-chlorethyl)imidazole (143 mg, 1.1 mmol) a směs byla míchána 24 h při lab. teplotě. Surový produkt precipitoval přidáním vody a byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 3%, 4% and 5% MeOH in CHCl₃. Krystalizace z CHCl₃ dala bezbarvý produkt, 0.21 g, ve výtěžku 45%, b.t. 208 - 211 °C, MS ESI + 471.1 (M + H)⁺, ESI - 469.1 (M - H)⁻. NMR: směs dvou tautomerů, ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.38 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂), 3.28-3.40 (m, 3H, -CH(CH₃)₂ + -CH₂-CH₂-), 4.25 (bs, 2H, -CH₂-CH₂-), 4.73 - 4.76 (m, 2H, NH-CH₂-), 6.87 (s, 1H, H_{Ar}), 7.15-7.57 (m, 5H, H_{Ar}), 8.12-7.83 (m, 5H, H_{Ar} + -NH-), 8.63 (s, 1H, H_{Ar}), 12.25 (s, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.70, 26.39, 31.16, 42.6, 43.23, 45.74, 119.18, 120.12, 122.55, 126.47, 126.69, 127.55, 128.02, 128.42, 137.19, 137.73, 139.45, 148.87, 149.51, 155.71, 159.76. Anal. (C₂₅H₂₈N₈S) C, H, N.

5-(3-Amino-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.27.**):

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol) v DMF (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.35 g), 3-bromopropylamin hydrochlorid (0.40 g, 1.8 mmol) a směs byla míchána 24 h při teplotě 45 °C. DMF byl odpařen ve vakuu při teplotě do 50 °C a produkt byl pak vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Zahuštěním ve vakuu bylo získáno 0.30 g produktu, ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, ve výtěžku 69%. ESI + 434.1 (M + H)⁺, ESI - 432.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.32 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 1.75 (pent., *J* = 7.03 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-); 2.66 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H, -CH₂-); 3.05 (t, *J* = 7.03 Hz, 2H, -CH₂-); 3.22 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.72 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.27-7.29 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, ArH); 7.79-7.83 (m, 1H, ArH); 7.87-7.89 (m, 1H, ArH); 8.01 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.42 (appt. bt, 1H, -NH-); 8.59-8.61 (m, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 22.2, 26.4, 28.0, 31.8, 40.3, 43.5, 120.6, 123.0, 123.9, 127.1, 128.3, 137.7, 138.0, 139.1, 140.5, 146.3, 150.0, 150.7, 156.3, 161.2. Anal. (C₂₃H₂₇N₇S) C, H, N.

5-[(Oxazolidin-2-on-5-yl)methyl]thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.28.**)

5 K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol) v DMF (5 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.15 g) a 5-chlormethyl-2-oxazolidinone (0.15 g, 1.1 mmol) a směs byla míchána 24 h při teplotě 45 °C. Surový produkt precipitoval přidáním vody a byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 4%, 5% a 6% MeOH in CHCl₃. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, 0.35 g, ve výtěžku 74%. MS ESI + 476.2 (M + H)⁺, ESI - 474.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CD₃OD): 1.38 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.26 (dd, *J* = 14.21 Hz, *J* = 7.34 Hz, 1H, -NH-CH_αH_β-CH-); 3.33 - 3.37 (m, 2H, -CH(CH₃)₂ + -S-CH_αH_β-CH-); 3.52 (bt, *J* = 8.80 Hz, 1H, -S-CH_αH_β-CH-); 3.63 (dd, *J* = 14.06 Hz, *J* = 4.89 Hz, 1H, -NH-CH_αH_β-CH-); 4.82 (bs, 2H, NH-CH₂-); 4.84 - 4.86 (m, 1H, -CH₂-CH-CH₂-); 7.30 (qd, *J* = 7.47 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 1.22 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.47 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.77 (d, *J* = 7.79 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.82 (td, *J* = 7.34 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.25 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.55 (d, *J* = 4.89, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CD₃OD): 22.2; 27.1; 35.1; 44.8; 45.7; 77.0; 122.5; 123.6; 128.3; 128.8; 138.8; 139.4; 141.1; 150.2; 158.5; 162.0; 162.4. Anal. (C₂₅H₂₇N₇O₂S) C, H, N.

20 5-(2,3-Diamino-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.29.**):

K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1 mmol) v DMF (5 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.15 g) a 2,3-di(benzyloxycarbonylamino)-1-chloropropan (0.41 g, 1.1 mmol; připravený dle lit.: Org. Chem. 1975, 40, 1653). Surový di-*Z*-chráněný produkt precipitoval přidáním vody. Dále byl derivát odchráněn rozpuštěním a stáním v 33% HBr/ AcOH (1 mL, lab. tep., 1 hod.). Po odpaření těkavých složek ve vakuu (do 50 °C) byl produkt vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 10%, 12% and 15% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, 0.31 g, ve výtěžku 69%. MS ESI + 449.1 (M + H)⁺, ESI - 447.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.29 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.50 (dd, *J* = 12.69 Hz, *J* = 7.03 Hz; 1H, NH₂-CH_αH_β-CH-); 2.73 (dd, *J* = 12.69 Hz, *J* = 3.67 Hz; 1H, NH₂-CH_αH_β-CH-); 2.92 - 3.00 (m, 2H, -S-CH_αH_β-CH- + -S-CH₂-CH-CH₂-); 3.20 - 3.27 (m, 2H, -CH(CH₃)₂ + -S-CH_αH_β-CH-); 3.79 (bs, 4H, 2 x -NH₂); 4.60 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.15 (qd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.21 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.25 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.56 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.66 (td, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.74 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.57 (d, *J* = 4.89, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.7; 21.8; 26.2; 36.6; 43.9; 46.6; 53.2; 120.7; 122.2; 124.8, 127.1; 127.8; 137.0; 138.2; 138.9; 139.0; 146.6; 149.4; 150.8; 156.8; 161.4. Anal. (C₂₃H₂₈N₈S) C, H, N.

40 5-(2-methylthio-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.30.**):

45 K roztoku 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.0 mmol) v DMF (6 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.2 g) and chlorethyl methyl sulfid (101 μL, 1 mmol) a směs byla míchána 16h při lab. teplotě. Reakční směs byla ve vakuu zahuštěna při teplotě do 50°C a zbytek byl vyextrahován mezi CHCl₃ and H₂O. Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂SO₄ a zahuštěny ve vakuu. Produkt byl pak vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% and 4% MeOH v CHCl₃ a vykrytalizoval z abs. Et₂O, 0.35g, ve výtěžku 74%, b.t. 140 - 141 °C. MS APCI + 474.3 (M + H)⁺, ESI - 472.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.32 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.11 (s, 3H, -S-CH₃); 2.79 - 2.82 (m, 2H, H₃C-S-CH₂-); 3.25 - 3.28 (m, 3H, -S-CH₂- + -CH(CH₃)₂); 4.61 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.65 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.13 - 7.19 (m, 3H, H_{Ar}); 7.59 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.69 - 7.73 (m, 3H, H_{Ar}); 7.58 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}); 12.09 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 15.2; 21.6; 26.2; 30.6; 34.0; 44.0; 121.0; 122.3; 127.0; 127.9;

137.2; 138.1; 138.7; 149.3; 156.9; 161.7. Anal. (C₂₃H₂₆N₆S₂) C, H, N.

5-(2-aminocyclohexyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.31.**):

5

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.0 mmol), DMF (10 mL) a 1 mL vodného 48% roztoku HBr byl pomalu přikapán 1,2-cyclohexenimin (0.60 mL, 5 mmol; připravený podle: Org. Synth., 87, 2010, 161-169) a směs byla míchána při lab. teplotě 24 h. Reakční směs byla neutralizována vodným roztokem Na₂CO₃ a produkt precipitoval. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 5%, 8% a 11% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Zahuštěním ve vakuu a pak krystalizací z CHCl₃ bylo získáno 0.06 g produktu, ve výtěžku 13%, b.t. 165 – 185 °C. MS APCI + 474.4 (M + H)⁺, APCI - 442.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.07 - 1.30 (m, 3H, H-cyclohexyl); 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.40 - 1.47 (m, 1H, H-cyclohexyl); 1.57 - 1.65 (m, 1H, H-cyclohexyl); 1.88 - 1.91 (m, 1H, H-cyclohexyl); 2.19 - 2.22 (m, 1H, H-cyclohexyl); 2.61 - 2.65 (m, 1H, H-cyclohexyl); 3.22 - 3.26 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂-); 3.35 - 3.47 (m, 1H, H-cyclohexyl); 4.72 - 4.81 (m, 2H, NH-CH₂-); 7.32 (qd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.86 Hz, *J* = 1.22, 1H, H_{Ar}); 7.47 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.85 (td, *J* = 7.34 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.91 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.05 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.27 (bs, 1H, -NH-); 8.64 (d, *J* = 4.89 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.5; 21.6; 24.2; 25.7; 30.5; 32.8; 34.9; 42.9; 52.2; 52.6; 79.0; 120.0; 122.4; 126.4; 127.7; 137.1; 137.4; 139.8; 149.4; 155.7; 160.8. Anal. (C₂₅H₂₉N₇S) C, H, N.

5-(3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.32.**):

25

2-Bromo-1,1,1-trifluoro-2-propanol (0.11 mL, 1.05 mmol) byl pomalu přikapán ke směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.0 mmol), K₂CO₃ (0.12 g) v DMF (6 mL) a směs byla míchána 4 h při lab. teplotě. Pak byla reakční směs zahuštěna ve vakuu při teplotě do 50°C a zbytek byl vyextrahován mezi CHCl₃ a H₂O. Po vysušení MgSO₄ spojených organických fází a jejich zahuštění ve vakuu byl produkt vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% and 4% MeOH in CHCl₃. Zahuštěním LC frakcí a následnou krystalizací z DCM bylo získáno 0.15 g produktu, ve výtěžku 31%, b.t. 174 - 177 °C. MS ESI + 489.1 (M + H)⁺, ESI - 487.1 (M - H)⁻. NMR: Dvě tautomerní formy zastoupené v poměru 2:1 ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.34 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂ form I); 1.37 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂ form II); 2.84 - 2.91 (m, 1H, -S-CH_αH_β- form I and II); 3.20 - 3.28 (m, H, -CH(CH₃)₂, form I and II); 3.61 (d, *J* = 13.75 Hz, 1H, -S-CH_αH_β, form II); 3.67 (dd, *J* = 13.75 Hz, *J* = 2.14 Hz, 1H, -S-CH_αH_β, form I); 4.23 (bs, 1H, S-CH₂-CH-form I and II); 4.72 (d, *J* = 5.81 Hz, 2H, NH-CH₂-, form II); 4.77 (d, *J* = 5.50 Hz, 2H, NH-CH₂-, form I); 6.59 (d, *J* = 6.72 Hz, 1H, CH-OH, form I and II); 7.29 - 7.33 (m, 1H, H_{Ar}, form I and II); 7.43 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}, form II); 7.49 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, H_{Ar}, form I); 7.82 - 7.87 (m, 1H, H_{Ar}, form I and II); 7.89 - 7.94 (m, 1H, H_{Ar}, form I and II); 8.01 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}, form II); 8.09 (m, 3H, H_{Ar} + -NH-CH₂-, form I); 8.62 - 8.65 (m, 1H, H_{Ar}, form I and II); 8.77 (bt, *J* = 5.81 Hz, 1H, -NH-CH₂-, form II); 12.21 (bs, 1H, -NH-, form I); 13.78 (bs, 1H, -NH-, form II). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): mixture of two forms 21.3; 21.4; 21.5; 24.9; 26.2; 26.4; 31.1; 42.4; 43.0; 67.8 (q, -CF₃, form I); 67.9 (q, -CF₃, form II); 119.9; 120.0 120.5; 122.3; 122.4; 124.2; 126.3; 126.5; 126.6; 127.6; 127.9; 130.5; 134.8; 137.0; 137.1; 137.7; 138.9; 139.3; 139.8; 140.3; 148.8; 149.4; 154.0; 155.6; 155.8; 160.0. Anal. (C₂₃H₂₃F₃N₆OS) C, H, N.

50 5-(Methoxymethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.33.**):

Chlormethyl methyl ether (31 μL, 0.41 mmol) byl přidán ke směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.14 g, 0.37 mmol) v DMF (3 mL) a K₂CO₃ (0.10 g). Směs byla míchána 4 h při lab. teplotě, dále byla zahuštěna ve vakuu

55

při teplotě do 50 °C a zbytek byl vyextrahován mezi CHCl₃ a H₂O. Po vysušení (MgSO₄) spojených organických fází a jejich zahuštění ve vakuu byl produkt vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 1%, 2% a 3% MeOH in CHCl₃. Zahuštěním LC frakcí a následnou krystalizací z DCM byl získán produkt 0.11 g, ve výtěžku 70%, b.t. 160 – 162 °C. MS ESI + 421.1 (M + H)⁺, ESI - 419.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.35 - 1.38 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.21 - 3.27 (m, 4H, -CH(CH₃)₂, -CH₃); 4.69 - 4.80 (m, 2H, NH-CH₂-); 5.29 - 5.34 (m, 2H, -S-CH₂-); 7.31 - 7.33 (m, 1H, H_{Ar}); 7.45 - 7.52 (m, 2H, H_{Ar}); 7.83 - 7.86 (m, 1H, H_{Ar}); 7.88 - 7.93 (m, 1H, H_{Ar}); 8.00 - 8.08 (m, 2H, H_{Ar}); 8.63 - 8.64 (m, 1H, H_{Ar}); 12.21 (bs, -NH-, form I); 13.79 (bs, -NH-, form II). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): mixture of two tautomeric forms. 21.5; 21.7; 24.8; 26.2; 42.5; 43.2; 55.9; 73.3; 120.0 120.6; 122.3; 122.4; 126.3; 126.6; 127.6; 128.0; 137.1; 137.7; 139.4; 139.8; 148.7; 148.9; 149.4; 153.9; 155.6; 155.8; 159.2. Anal. (C₂₂H₂₄N₆OS) C, H, N.

5-(2-Methylamino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.34.**)

2-Bromo-N-methylethylamin hydrobromide (0.66 g, 3.0 mmol; byl připraven dle lit.: Amanda et al.: Soft Matter. 2011, 7, 5627-5637) byl přidán ke směsi 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.0 mmol) a NaHCO₃ (0.50 g) v DMF (8 mL). Reakční směs byla míchána 2 dny při lab. teplotě a pak byla zahuštěna ve vakuu při teplotě do 50°C. Odparek byl extrahován mezi CHCl₃ and H₂O. Po vysušení (MgSO₄) spojených organických fází a jejich zahuštění ve vakuu byl produkt vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 6%, 8% and 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu bylo získáno 0.07 g produktu, ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, ve výtěžku 16%. MS ESI + 434.1 (M + H)⁺, ESI - 432.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.43 (s, 3H, -NH-CH₃); 3.01 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.23 (m, 3H, -CH(CH₃)₂ + -CH₂-CH₂-); 4.66 (s, 2H, NH-CH₂-); 7.19-7.16 (m, 1H, H_{Ar}); 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.45 (bs, 1H, -NH); 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.68 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 21.50, 21.73, 26.22, 29.47, 29.67, 34.70, 44.01, 50.73, 120.76, 122.22, 127.03, 127.82, 128.03, 137.02, 138.18, 138.67, 139.07, 149.39, 150.50, 156.97, 161.25. Anal. (C₂₃H₂₇N₇S) C, H, N.

5-(2-sulfanylethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.35.**):

Roztok 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.1.** (0.38 g, 1.0 mmol) a thiiranu (1.02 g) a 4 kapek triethylaminu v DMF (14 mL) byl zahříván na 60 °C/ 6 hodin v autoklavu. Surový produkt byl získán po ochlazení na laboratorní teplotu a zředěním 40 mL DEMI vody ve formě sraženiny. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 3%, 4% a 5% MeOH in CHCl₃. Po odpaření rozpouštědel ve vakuu bylo získáno 0.196 g produktu, ve formě amorfni bezbarvé sklovité pěny, ve výtěžku 45%. MS ESI + 436.7 (M + H)⁺, ESI - 434.7 (M - H)⁻ a 871.0 (2M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, CDCl₃): 1.39 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂), 2.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, -CH₂-), 3.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, -CH₂-), 3.34 (sept., *J* = 7.0 Hz, 1H, -CH(CH₃)), 4.69 (bd, *J* = 4.0 Hz, 2H, NH-CH₂-), 6.56 (bs, 1H, -NH-), 7.25-7.23 (m, 3H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.74-7.80 (m, 3H, H_{Ar}), 8.64 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 21.64, 24.88, 26.26, 35.21, 44.15, 121.09, 122.45, 127.21, 127.97, 137.29, 138.30, 138.82, 149.43, 157.07, 161.53. Anal. (C₂₂H₂₄N₆S₂) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(imidazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.50.**):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(imidazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.3.** (0.37 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxid (katal. množství, 40 mg) v MeOH (4 mL) byl přidán oxiran (80 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs

byla míchána při laboratorní teplotě 16 h. Produkt byl nejprve izolován ve formě precipitátu po přidání vody. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% a 4% MeOH v CHCl₃ a byl získán ve formě bezbarvé amorfni tuhé pěny 0.35 g produktu, ve výtěžku 85 %. Krystalizací z DCM bylo získáno 0.30 g tj. 72 %, b.t. 173 - 175 °C, UV (nm): 244 λ_{max}, 315 λ_{max}. MS ESI + 410.1 (M + H)⁺, ESI - 408.1 (M - H)⁻. NMR: Směs dvou tautomerů (2:1). ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.31-1.41 (m, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.13 (m, 2H, -CH₂-); 3.25 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.65-3.59 (m, 2H, -CH₂-); 4.66 - 4.74 (m, 2H, -CH₂-NH); 4.91 (t, J = 5.5 Hz, 1H, -OH); 7.07 - 7.09 (m, 1H, H_{Ar}); 7.72-7.47 (m, 5H, H_{Ar}); 8.04 (t, J = 5.3 Hz, -NH isomer A); 8.20-8.30 (m, 1H, H_{Ar}); 8.75 (t, J = 6.0 Hz, -NH, isomer B); 12.17 (s, -NH, isomer A); 13.78 (s, -NH isomer B), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.6, 21.8, 24.9, 26.3, 33.0, 42.2, 42.8, 54.9, 60.5, 60.6, 118.0, 120.2, 120.4, 128.8, 129.1, 129.7, 129.8, 135.5, 135.6, 135.9, 137.4, 138.4, 140.0, 148.6, 148.8, 153.7, 160.7. Anal. (C₂₀H₂₃N₆OS) C, H, N.

5-(2-Amino-1-ethylthio-3-isopropyl-7-[4-(imidazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.57**):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(imidazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.3**. (1.0 g, 2.66 mmol) a 3.1 mL 48% HBr v DMF (20 mL) byl za laboratorní teploty přikapán aziridin (0.42 mL, 8 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h, pak byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na₂CO₃ a surový product byl vyizolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.60 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 55 %. MS ESI + 409.2 (M + H)⁺, ESI - 407.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.35 (d, J = 6.7 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.85 (t, J = 6.7 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.10 (t, J = 6.6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.26 (sept., J = 7.0 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.77 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.08 (s, 1H, H_{Ar}), 7.50 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.61 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.70 (s, 1H, H_{Ar}), 8.22 (s, 1H, H_{Ar}), 8.44 (s, 1H, -NH). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.74, 25.87, 33.07, 41.12, 42.67, 48.60, 118.03, 120.36, 128.94, 129.83, 135.49, 135.82, 137.85, 160.41. Anal. (C₂₀H₂₄N₈S) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-1-ethylthio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.80**):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.2**. (0.37 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (4 mL) byl přidán oxiran (80 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 h. Produkt byl nejprve izolován ve formě precipitátu po přidání vody. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% a 4% MeOH v CHCl₃ a byl získán ve formě bezbarvé amorfni tuhé pěny 0.35 g produktu, ve výtěžku 85 %. UV (nm): 248 λ_{max}, 268 sh, 313 λ_{max}. MS ESI + 410.1 (M + H)⁺, ESI - 408.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.22 (d, J = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.18 (sept., J = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.22 (dd, J = 4.58 Hz, J = 4.74 Hz, 2H, -S-CH₂-); 3.96 (dd, J = 4.89 Hz, J = 5.04 Hz, 2H, -CH₂-O); 4.62 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.39 (dd, J = 2.45 Hz, J = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.17 (d, J = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.35 (bs, 1H, -NH-); 7.39 (d, J = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.63 (d, J = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.79 (d, J = 2.45 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.5; 26.0; 34.2; 43.8; 64.4; 107.7; 119.3; 127.2; 128.7; 136.0; 139.1; 141.1; 163.4. Anal. (C₂₀H₂₃N₇OS) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-1-propylthio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (**4.81**):

K směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.2**. (0.37 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán methyloxiran (130 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 6 h. Surový produkt byl získán vysrážením vodou z reakční směsi a byl dále vyčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu postupně v soustavě 1%, 2%, and 3%

MeOH v CHCl₃. Produkt byl krystalizován z DCM/Et₂O a bylo získáno 0.25 g produktu, ve výtěžku 59%, b.t. 126 - 131 °C. MS ESI + 424.1 (M + H)⁺, ESI - 422.1 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.20 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.26 (d, *J* = 6.11 Hz, 3H, -CH₃); 3.08 (dd, *J* = 15.13 Hz, *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH_αH_{β-}); 3.17 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.27 (dd, *J* = 14.82 Hz, *J* = 2.45 Hz, 1H, -CH_αH_{β-}); 4.20 - 4.23 (m, 1H, -CH-); 4.64 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.40 (t, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.19 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.40 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.65 (d, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.80 (d, *J* = 2.45 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.6; 21.7; 22.8; 26.2; 39.9; 43.9; 69.2; 107.8; 119.5; 127.3; 128.9; 136.2; 139.3; 141.2; 163.7. Anal. (C₂₁H₂₅N₇OS) C, H, N.

5-(2-Amino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.87):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.2**. (1.0 g, 2.66 mmol) a 3.1 mL 48% HBr v DMF (20 mL) byl za laboratorní teploty přikápan aziridin (0.42 mL, 8 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h, pak byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na₂CO₃ a surový produkt byl vyizolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.69 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 63 %. MS ESI + 409.2 (M + H)⁺, ESI - 407.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.35 (d, *J* = 6.7 Hz, -CH(CH₃)₂); 2.99 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, -CH₂-), 3.19 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, -CH₃-), 3.26 (sept., *J* = 6.8 Hz, 1H, -CH(CH₃)₃); 4.73 (s, 2H, -NH-CH₂-); 6.51 (s, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.71 (s, 1H, H_{Ar}); 7.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.45 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.70 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.7; 25.9; 30.6; 40.5; 42.6; 107.7; 118.4; 127.6; 128.5; 128.6; 136.9; 138.6; 140.8; 159.9. Anal. (C₂₀H₂₄N₈S) C, H, N.

5-(2-Amino-2-methyl-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.90):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.2**. (0.72 g, 2.0 mmol) a 0.6 mL 48% HBr v DMF (6 mL) byl za laboratorní teploty přikápan 2,2-dimethylaziridin (0.31 mL, 4.2 mmol, syntetizovaný dle Org. Synth. 1955 Coll. 3:148.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h, pak byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na₂CO₃ a surový produkt byl vyizolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH in CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.49 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 56%. MS ESI + 437.2 (M + H)⁺ 100%, ESI - 435.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.05 (bs, 6H, -C(CH₃)₂); 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.21 (s, 2H, -CH₂-); 3.26 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 4.72 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.51 - 6.52 (m, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.71 (d, *J* = 1.53 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.80 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.30 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 8.45 (d, *J* = 2.14 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 21.7; 25.8; 28.9; 42.7; 44.0; 50.4; 107.7; 118.4; 127.6; 128.5; 136.9; 138.3; 138.7; 140.8; 145.4; 150.2; 160.9. Anal. (C₂₂H₂₈N₈S) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-2-methyl-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.93):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.2**. (0.37 g, 1 mmol), and tetramethylamonium hydroxid (katal. množství, 40 mg) v MeOH (6 mL) byl přidán 1,2-epoxy-2,2-dimethylpropan (0.12 mL, 1.3 mmol) v 2 mL MeOH a směs byla míchána 7 h při laboratorní teplotě. Surový produkt byl získán ve formě precipitátu po přidání vody. Čistý produkt byl získán sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 2%, 3% MeOH v CHCl₃. Odpařením rozpouštědel ve vakuu byl získán produkt ve formě amorfni bezbarvé tuhé pěny 0.24 g, výtěžek 55%. MS ESI + 438.1 (M + H)⁺, ESI - 436.1 (M - H)⁻. ¹H

(500 MHz; CDCl₃): 1.16 (bs, 6H, -CH(CH₃)₂); 1.36 (s, 6H, -C(CH₃)₂); 3.13 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.22 (s, 2H, -CH₂-); 4.64 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.40 - 6.41 (m, 1H, H_{Ar}); 7.18 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.40 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.66 (d, *J* = 1.22 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.82 (d, *J* = 2.14 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.4; 26.1; 29.3; 43.6; 44.4; 72.0; 107.6; 119.3, 127.1; 128.7, 136.1; 139.1; 141.0; 163.8. Anal. (C₂₂H₂₇N₇OS) C, H, N.

5-(2,3-Dihydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.94):

K roztoku 3 -isopropyl-7-[4-(pyrazol-1 -yl)benzyl] amino-1 (2)H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5 -thiolu **3.2**. (0.37 g, 1 mmol) v DMF (3 mL) a *tetramethylamonium hydroxid* (0.11 g) byl přidán 3-chloro-1,2- propandiol (130 μL, 1.5 mmol) a směs byla míchána 24 h při lab. teplotě. Surový produkt precipitoval přidavkem vody a byl pak vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% , 4% a 5% MeOH v CHCl₃. Amorfni bezbarvá tuhá pěna produktu 0.21 g, byla získána ve výtěžku 48%. MS ESI + 440.1 (M + H)⁺ 10%, 462.2 (M + Na)⁺ 100% , ESI - 438.2 (M - H)⁻. NMR: Směs dvou isomerů/tautomerů 2/1: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.34 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂, form A); 1.37 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂, form B); 3.04 - 3.08 (m, 1H, -CH_αH_β-S); 3.22 - 3.32 (m, 2H, -CH₂(CH₃)₂ + -CH_αH_βS); 3.71-3.73 (m, 1H, -CH-O); 4.59 - 4.62 (m, 1H, -CH₂-OH); 4.68 (bd, *J* = 5.50 Hz, 2H, -CH₂-NH, form B); 4.74 (d, *J* = 5.20 Hz, -CH₂-NH, form A); 4.97 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH-OH, form A); 5.04 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, CH-OH, form B); 6.50 - 6.52 (m, 1H, H_{Ar}); 7.46 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}, form B); 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}, form A); 7.69 (bs, 1H, H_{Ar}, form B); 7.71 (bs, 1H, H_{Ar}, form A); 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{Ar}, form B); 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{Ar}, form A); 8.04 (t, *J* = 5.2 Hz, -NH, form A); 8. 41 (bs, 1H, H_{Ar}, form B); 8.44 (d, 1H, H_{Ar}, form A); 8.20-8.30 (m, 1H, H_{Ar}); 8.69 (app. bt, -NH, isomer B); 12.17 (bs, -NH, form A); 13.75 (bs, -NH form B). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.61, 21.73, 24.80, 26.25, 34.33, 42.29, 42.89, 64.73, 71.03, 71.21, 107.63, 107.75, 118.27, 118.48, 120.39, 127.56, 127.62, 128.55, 128.89, 130.40, 134.82, 136.53, 137.49, 138.50, 138.75, 138.87, 139.80, 140.71, 140.84, 148.56, 148.77, 153.70, 161.42, 161.55. Anal. (C₂₁H₂₅N₇O₂S) C, H, N.

5-(3-Amino-2-hydroxy-1-propyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazol-1-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.97):

K roztoku 3 -isopropyl-7-[4-(pyrazol-1 -yl)benzyl] amino-1 (2)H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5 -thiolu **3.2**. (0.37g, 1 mmol) v MeOH (10 mL) byl přidán K₂CO₃ (0.17 g) a 3-benzylidenamino-1-chlorpropan-2-ol (0.22 g, 1.3 mmol; R/S z R/S epichlorhydrinu podle literatury: Org. Proc. Res. Develop., 2003, No 7, 539) a směs byla míchána 24 h při 40 °C. Reakční směs byla okyselena konc. aq. HCl a byla míchána 5 h při 45 °C. Surový produkt byl získán po zahuštění ve vakuu při teplotě do 50 °C, zalkalizování přidáním roztoku 1g Na₂CO₃ v 10 ml vody, a vykrystalováním v ledniče z tohoto vodného roztoku. Vyčištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 5%, 8% and 10% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.20 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 45%. MS ESI + 439.3 (M + H)⁺ 100%, ESI - 437.2 (M - H)⁻, NMR: ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.34 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.57 (bs, 1H, -CH_αH_β-NH₂); 2.76 (bs, 1H, -CH_αH_β-NH₂); 3.09 - 3.14 (m, 1H, -CH_αH_β-S-); 3.19 - 3.22 (m, 1H, -CH_αH_β-S-); 3.25 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.71 (bs, 1H, -CH-); 4.71 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.51 (dd, *J* = 2.45 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.48 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.71 (d, *J* = 1.57 Hz, 1H, H_{Ar}); 7.79 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.44 (d, *J* = 2.14 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.83 (bs, 1H, -NH-CH₂-). ¹³C (125 MHz; DMSO- *d*₆): 21.7; 25.9; 34.7; 42.6; 45.8; 70.5; 107.7; 118.4, 127.6; 128.7, 137.0; 138.3; 138.7; 140.8; 145.8; 150.2; 160.8. Anal. (C₂₁H₂₆N₈OS) C, H, N.

5-(2-Hydroxy-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(imidazol-4-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.109.):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(imidazol-4-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5- thiolu **3.5**. (0.37 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxid (katal. množství,

40 mg) v MeOH (4 mL) byl přidán oxiran (80 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 8 h. Produkt byl nejprve izolován ve formě precipitátu po přidání vody. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 4% a 8% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH a byl získán ve formě bezbarvé amorfni tuhé pěny 0.23 g produktu, ve výtěžku 56 %. UV (nm): 259 (široký) λ_{\max} , 312 λ_{\max} . MS ESI + 410.2 (M + H)⁺, ESI - 408.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.10-3.16 (m, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.22-3.26 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.64 (s, 2H, -CH₂-CH₂-); 4.68 (bs, 2H, NH-CH₂-); 4.88 (bs, 1H, -OH); 7.37 (d, 2H, *J* = 7.45 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.53 (s, 1H, H_{Ar}); 7.67 (s, 1H, H_{Ar}); 7.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.94 (bs, 1H, -NH), 12.16 (bs, 2H, -NH). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.4, 21.6, 26.3, 33.0, 43.3, 60.5, 79.1, 120.4, 124.0, 124.3, 127.7, 128.0, 135.8, 136.1, 139.9, 148.6, 148.7, 160.7. Anal. (C₂₀H₂₃N₇OS) C, H, N.

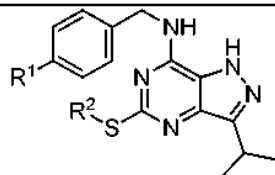
5-(2-Hydroxy-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazin-2-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.133):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazin-2-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.4**. (0.37 g, 1 mmol), a tetramethylamonium hydroxidu (katal. množství, 40 mg) v MeOH (4 mL) byl přidán oxiran (80 mg, 1.8 mmol, rozpuštěný v 2 mL MeOH) a směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 h. Produkt byl nejprve izolován ve formě precipitátu po přidání vody. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě: postupně 2%, 3% a 4% MeOH v CHCl₃ a byl získán ve formě bezbarvé amorfni tuhé pěny 0.23 g produktu, ve výtěžku 55 %. Produkt vykrytalizoval z DCH/Et₂O, b.t. 140-142 °C, UV (nm): 246 λ_{\max} , 307 λ_{\max} . MS ESI + 422.2 (M + H)⁺, ESI - 420.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 3.253.19 (m, 3H, -CH(CH₃)₂ + -CH₂-CH₂-), 4.01 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-), 4.74 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, NH-CH₂-); 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}); 7.37 (bs, 1H, -NH); 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.44 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.56 (m, 1H, H_{Ar}); 8.88 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 21.53, 25.97, 34.33, 44.20, 64.54, 127.01, 128.38, 135.32, 137.08, 139.61, 141.90, 142.77, 144.14, 150.88, 152.18, 163.60. Anal. (C₂₁H₂₃N₇OS) C, H, N.

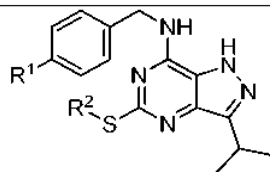
5-(2-Amino-1-ethyl)thio-3-isopropyl-7-[4-(pyrazin-2-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (4.139):

K míchané směsi 3-isopropyl-7-[4-(pyrazin-2-yl)benzyl]amino-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-thiolu **3.4**. (0.50 g, 1.33 mmol) a 1.6 mL 48% HBr v DMF (10 mL) byl za laboratorní teploty přikápan aziridin (0.22 mL, 4 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 h, pak byla neutralizována vodným nasyceným roztokem Na₂CO₃ a surový product byl vyizolován ve formě precipitátu. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií v soustavě postupně 3%, 5%, 7% a 10% MeOH v CHCl₃ s malým množstvím aq. NH₄OH. Po zahuštění ve vakuu bylo získáno: 0.25 g amorfni bezbarvé tuhé pěny produktu, ve výtěžku 45%. MS ESI + 421.2 (M + H)⁺, ESI - 419.2 (M - H)⁻. NMR: ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, -CH(CH₃)₂); 2.93 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.14 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-); 3.27 (sept., *J* = 7.2 Hz, 1H, -CH(CH₃)₃); 4.77 (bs, 2H, NH-CH₂-); 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H_{Ar}); 8.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H_{Ar}); 8.62 (bs, 1H, -NH); 8.69 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, H_{Ar}); 9.22 (s, 1H, H_{Ar}). ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.6, 21.7, 25.8, 31.7, 40.4, 42.9, 56.0, 123.6, 126.7, 128.0, 134.6, 138.4, 141.1, 141.9, 143.2, 144.2, 150.3, 151.2, 160.0. Anal. (C₂₁H₂₄N₈S) C, H, N.

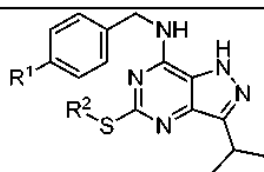
Tabulka 1: 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny připravené podle příkladu 1.



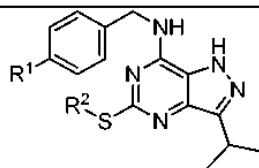
Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
4.1.	2-hydroxyethyl	pyrid-2-yl	62.73, 5.86, 19.78	419,2	421,2
4.2.	prop-2-en-1-yl	pyrid-2-yl	66.30, 5.89, 20.08	415,2	417,3
4.3.	2-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	63.55, 6.06, 19.24	433,2	435,2
4.3a.	2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	63.54, 6.08, 19.20	433,2	435,2
4.3b.	2(S)-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	63.51, 6.10, 19.17	433,2	435,2
4.4.	3-hydroxy-2-butyl	pyrid-2-yl	64.20, 6.36, 18.49	447,2	449,2



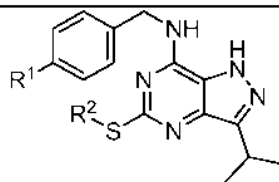
Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
4.5.	1-hydroxy-2-butyl	pyrid-2-yl	64.19, 6.34, 18.53	447.2	449.2
4.6.	2-carbamoyl-1-ethyl	pyrid-2-yl	61.68, 5.63, 21.88	446.2	448.2
4.7.	carbamoylmethyl	pyrid-2-yl	60.90, 5.44, 22.45	432.2	434.2
4.8.	3-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	63.55, 6.13, 19.33	433.2	435.2
4.9.	2-amino-1-ethyl	pyrid-2-yl	62.78, 6.30, 23.17	418.2	420.2
4.10.	2-guanidino-1-ethyl	pyrid-2-yl	59.83, 5.99, 27.25	460.2	462.3
4.11.	2-ureido-1-ethyl	pyrid-2-yl	59.70, 5.88, 24.24	461.2	463.3
4.12.	2-acetylamino-1-ethyl	pyrid-2-yl	62.44, 5.93, 21.24	460.2	462.2
4.13.	2-amino-2-methyl-1-propyl	pyrid-2-yl	64.11, 6.66, 21.70	446.2	448.2
4.14.	2-hydroxycyklohex-1-yl	pyrid-2-yl	65.76, 6.37, 17.70	473.2	475.3
4.15.	2-hydroxy-1-butyl	pyrid-2-yl	64.20, 6.34, 18.69	447.2	449.2
4.15a.	2(R)-hydroxy-1-butyl	pyrid-2-yl	64.15, 6.38, 18.60	447.2	449.2
4.15b.	2(S)-hydroxy-1-butyl	pyrid-2-yl	64.11, 6.36, 18.62	447.2	449.2
4.16.	2-hydroxycyklopent-1-yl	pyrid-2-yl	65.00, 6.15, 18.15	459.2	461.2
4.17.	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	pyrid-2-yl	64.26, 6.35, 18.68	447.2	449.2
4.18.	2,3-dihydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.30, 5.89, 18.63	449.2	451.2
4.18a.	2(R),3-dihydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.28, 5.85, 18.60	449.2	451.2
4.18b.	2(S),3-dihydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.28, 5.83, 18.60	449.2	451.2
4.19.	2-(dimethylamino)ethyl	pyrid-2-yl	64.30, 6.66, 21.75	446.2	448.2
4.20.	3-(dimethylamino)prop-1-yl	pyrid-2-yl	64.94, 6.86, 21.24	460.2	462.2
4.21.	1-hydroxy-3-methyl-2-butyl	pyrid-2-yl	64.88, 6.66, 18.01	461.2	463.3
4.22.	β-D-glukopyranosyl	pyrid-2-yl	57.97, 5.59, 15.55	537.3	539.3
4.23.	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.33, 6.16, 21.71	448.2	450.2
4.23a.	3-amino-2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.30, 6.24, 21.77	448.2	450.2
4.23b.	3-amino-2(S)-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	61.30, 6.30, 21.72	448.2	450.2
4.24.	3-(4-morfolinyl)-2-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	62.29, 6.40, 18.67	518.3	520.3
4.25.	3-(1-piperazinyl)-2-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	62.45, 6.81, 21.51	517.3	519.3
4.26.	2-(1-imidazolyl)ethyl	pyrid-2-yl	63.77, 5.77, 23.65	469.3	471.3
4.27.	3-amino-1-propyl	pyrid-2-yl	63.50, 6.57, 22.38	432.2	434.2
4.28.	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	pyrid-2-yl	60.61, 5.39, 20.60	474.3	476.3
4.29.	2,3-diamino-1-propyl	pyrid-2-yl	61.39, 6.50, 24.69	447.2	449.2
4.30.	2-(methylthio)-1-ethyl	pyrid-2-yl	61.28, 5.96, 18.55	449.2	451.2
4.31.	2-aminoocyklohexyl	pyrid-2-yl	65.74, 6.81, 20.57	472.3	474.3
4.32.	3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-1-propyl	pyrid-2-yl	56.50, 4.78, 17.11	487.3	489.3
4.33.	methoxymethyl	pyrid-2-yl	62.77, 5.82, 19.80	419.2	421.2
4.34.	2-(methylamino)-1-ethyl	pyrid-2-yl	63.48, 6.39, 22.50	432.2	434.2
4.35.	2-sulfanylethyl	pyrid-2-yl	60.48, 5.51, 19.18	435.2	437.2
4.36.	ethyl	pyrid-2-yl	65.30, 6.00, 20.71	403.2	405.2
4.37.	propyl	pyrid-2-yl	59.89, 6.28, 20.00	417.2	419.2



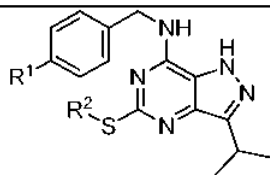
č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-H] ⁻	[M+H] ⁺
				a)	b)
4.38	butyl	pyrid-2-yl	66.60, 6.72, 19.31	431,2	433,2
4.39	2-hydroxypent-3-yl	pyrid-2-yl	64.85, 6.66, 18.01	461,2	463,2
4.40	4-hydroxybut-2-yl	pyrid-2-yl	64.22, 6.29, 18.65	447,2	449,2
4.41	4-(dimethylamino)butyl	pyrid-2-yl	65.64, 7.20, 20.62	474,3	476,3
4.42	2-(diethylamino)ethyl	pyrid-2-yl	65.61, 7.05, 20.52	474,3	476,3
4.43	3-(diethylamino)propyl	pyrid-2-yl	66.01, 7.30, 20.00	488,3	490,3
4.44	3-aminocyklohexyl	pyrid-2-yl	65.83, 6.50, 20.57	472,3	474,3
4.45	4-aminocyklohexyl	pyrid-2-yl	65.82, 6.84, 20.50	472,3	474,3
4.46	4-aminobutyl	pyrid-2-yl	64.19, 6.71, 21.76	446,2	448,2
4.47	5-aminopentyl	pyrid-2-yl	64.94, 6.84, 21.21	460,2	462,3
4.48	3-hydroxy-3-methylbutyl	pyrid-2-yl	64.90, 6.58, 18.14	461,2	463,3
4.49	2-amino-3-hydroxypropyl	pyrid-2-yl	61.40, 6.16, 21.71	448,2	450,2
4.50	2-hydroxyethyl	imidazol-1-yl	58.55, 5.68, 23.90	408,2	410,2
4.51	2-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	59.50, 6.19, 23.03	422,2	424,2
4.51a	2(R)-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	59.48, 6.21, 23.00	422,2	424,2
4.51b	2(S)-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	59.51, 6.09, 23.00	422,2	424,2
4.52	3-hydroxy-2-butyl	imidazol-1-yl	60.30, 6.42, 22.35	436,2	438,2
4.53	1-hydroxy-2-butyl	imidazol-1-yl	60.30, 6.32, 22.30	436,2	438,2
4.54	2-carbamoyl-1-ethyl	imidazol-1-yl	57.76, 5.60, 25.57	435,2	437,2
4.55	carbamoylmethyl	imidazol-1-yl	56.81, 5.30, 26.42	421,2	423,2
4.56	3-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	59.55, 5.99, 23.01	422,2	424,2
4.57	2-aminoethyl	imidazol-1-yl	58.78, 6.07, 27.45	407,2	409,2
4.58	2-ureidoethyl	imidazol-1-yl	55.76, 5.65, 27.83	450,2	452,2
4.59	2-acetylamino(ethyl)	imidazol-1-yl	58.60, 5.93, 24.62	449,2	451,2
4.60	2-amino-2-methyl-1-propyl	imidazol-1-yl	60.49, 6.69, 25.66	435,2	437,2
4.61	2-hydroxy-1-butyl	imidazol-1-yl	60.30, 6.11, 22.22	436,2	438,2
4.61a	2(R)-hydroxy-1-butyl	imidazol-1-yl	60.28, 6.10, 22.18	436,2	438,2
4.61b	2(S)-hydroxy-1-butyl	imidazol-1-yl	60.31, 6.10, 22.20	436,2	438,2
4.62	2-hydroxycyklopent-1-yl	imidazol-1-yl	61.40, 6.33, 21.70	448,2	450,2
4.63	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	imidazol-1-yl	60.33, 6.34, 22.30	436,2	438,2
4.64	2,3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.31, 5.74, 22.30	438,2	440,2
4.64a	2(R),3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.29, 5.78, 22.27	438,2	440,2
4.64b	2(S),3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.30, 5.70, 22.28	438,2	440,2
4.65	2-(dimethylamino)ethyl	imidazol-1-yl	60.45, 6.67, 25.48	435,2	437,2
4.66	3-(dimethylamino)prop-1-yl	imidazol-1-yl	61.21, 6.93, 24.76	449,2	451,2
4.67	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.51, 6.09, 25.45	437,2	439,2
4.67a	3-amino-2(R)-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.47, 6.18, 25.35	437,2	439,2
4.67b	3-amino-2(S)-hydroxy-1-propyl	imidazol-1-yl	57.45, 6.20, 25.34	437,2	439,2
4.68	2-(1-imidazolyl)ethyl	imidazol-1-yl	60.06, 5.76, 27.29	458,2	460,2



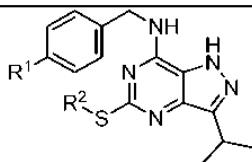
Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
4.69	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	imidazol-1-yl	56.80, 5.42, 24.11	463,2	465,3
4.70	2-aminocyklohexyl	imidazol-1-yl	62.14, 6.79, 24.01	461,2	463,2
4.71	methoxymethyl	imidazol-1-yl	58.64, 5.64, 23.77	408,2	410,2
4.72	2-(methylamino)ethyl	imidazol-1-yl	59.60, 6.49, 26.41	421,2	423,2
4.73	ethyl	imidazol-1-yl	61.03, 5.80, 24.96	392,2	394,2
4.74	2-hydroxypent-3-yl	imidazol-1-yl	61.14, 6.58, 21.61	450,2	452,2
4.75	4-hydroxybut-2-yl	imidazol-1-yl	60.29, 6.52, 22.20	436,2	438,2
4.76	3-aminocyklohexyl	imidazol-1-yl	62.22, 6.73, 24.00	461,2	463,2
4.77	4-aminocyklohexyl	imidazol-1-yl	62.19, 6.75, 24.03	461,2	463,2
4.78	2-amino-3-hydroxypropyl	imidazol-1-yl	57.48, 6.12, 25.37	437,2	439,2
4.80	2-hydroxyethyl	pyrazol-1-yl	58.50, 5.69, 23.90	408,2	410,2
4.81	2-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	59.48, 6.08, 23.08	422,2	424,2
4.81a	2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	59.48, 6.05, 23.05	422,2	424,2
4.81b	2(S)-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	59.50, 6.02, 22.97	422,2	424,2
4.82	3-hydroxy-2-butyl	pyrazol-1-yl	60.28, 6.48, 22.34	436,2	438,2
4.83	1-hydroxy-2-butyl	pyrazol-1-yl	60.27, 6.34, 22.28	436,2	438,2
4.84	2-carbamoyl-1-ethyl	pyrazol-1-yl	57.76, 5.62, 25.55	435,2	437,2
4.85	carbamoylmethyl	pyrazol-1-yl	56.80, 5.32, 26.40	421,2	423,2
4.86	3-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	59.50, 5.98, 23.00	422,2	424,2
4.87	2-amino-1-ethyl	pyrazol-1-yl	58.76, 6.08, 27.45	407,2	409,2
4.88	2-ureido-1-ethyl	pyrazol-1-yl	55.75, 5.69, 27.81	450,2	452,2
4.89	2-acetylamino(ethyl)	pyrazol-1-yl	58.61, 5.95, 24.61	449,2	451,2
4.90	2-amino-2-methyl-1-propyl	pyrazol-1-yl	60.48, 6.72, 25.66	435,2	437,2
4.91	2-hydroxy-1-butyl	pyrazol-1-yl	60.31, 6.10, 22.24	436,2	438,2
4.91a	2(R)-hydroxy-1-butyl	pyrazol-1-yl	60.26, 6.11, 22.10	436,2	438,2
4.91b	2(S)-hydroxy-1-butyl	pyrazol-1-yl	60.30, 6.12, 22.20	436,2	438,2
4.92	2-hydroxycyklopent-1-yl	pyrazol-1-yl	61.42, 6.35, 21.68	448,2	450,2
4.93	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	pyrazol-1-yl	60.31, 6.36, 22.28	436,2	438,2
4.94	2,3-dihydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.33, 5.76, 22.30	438,2	440,2
4.94a	2(R),3-dihydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.32, 5.77, 22.29	438,2	440,2
4.94b	2(S),3-dihydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.34, 5.72, 22.26	438,2	440,2
4.95	2-(dimethylamino)ethyl	pyrazol-1-yl	60.43, 6.68, 25.45	435,2	437,2
4.96	3-(dimethylamino)prop-1-yl	pyrazol-1-yl	61.22, 6.94, 24.74	449,2	451,2
4.97	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.50, 6.19, 25.38	437,2	439,2
4.97a	3-amino-2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.47, 6.20, 25.34	437,2	439,2
4.97b	3-amino-2(S)-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	57.44, 6.22, 25.36	437,2	439,2
4.98	2-(1-imidazolyl)ethyl	pyrazol-1-yl	60.08, 5.75, 27.28	458,2	460,2
4.99	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	pyrazol-1-yl	56.76, 5.49, 24.11	463,2	465,3
4.100	2-aminocyklohexyl	pyrazol-1-yl	62.18, 6.69, 24.04	461,2	463,2



Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-II] a)	[M-III] b)
4.101	methoxymethyl	pyrazol-1-yl	58.65, 5.69, 23.78	408.2	410.2
4.102	2-(methylamino)ethyl	pyrazol-1-yl	59.58, 6.50, 26.41	421.2	423.2
4.103	ethyl	pyrazol-1-yl	61.00, 5.89, 24.90	392.2	394.2
4.104	2-hydroxypent-3-yl	pyrazol-1-yl	61.12, 6.59, 21.56	450.2	452.2
4.105	4-hydroxybut-2-yl	pyrazol-1-yl	60.30, 6.54, 22.19	436.2	438.2
4.106	3-amino-cyklohexyl	pyrazol-1-yl	62.20, 6.80, 24.01	461.2	463.2
4.107	4-amino-cyklohexyl	pyrazol-1-yl	62.21, 6.70, 24.05	461.2	463.2
4.108	2-amino-3-hydroxypropyl	pyrazol-1-yl	57.44, 6.22, 25.39	437.2	439.2
4.109	2-hydroxyethyl	imidazol-4-yl	58.51, 5.68, 23.88	408.2	410.2
4.110	2-hydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	59.44, 6.11, 23.06	422.2	424.2
4.110a	2(R)-hydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	59.49, 6.02, 23.04	422.2	424.2
4.111	3-hydroxy-2-butyl	imidazol-4-yl	60.19, 6.50, 22.34	436.2	438.2
4.112	2-carbamoyl-1-ethyl	imidazol-4-yl	57.77, 5.63, 25.53	435.2	437.2
4.113	carbamoylmethyl	imidazol-4-yl	56.80, 5.30, 26.41	421.2	423.2
4.114	3-hydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	59.49, 5.99, 23.06	422.2	424.2
4.115	2-amino-1-ethyl	imidazol-4-yl	58.75, 6.09, 27.46	407.2	409.2
4.116	2-ureido-1-ethyl	imidazol-4-yl	55.73, 5.71, 27.80	450.2	452.2
4.117	2-acetyl-amino(ethyl)	imidazol-4-yl	58.60, 5.92, 24.63	449.2	451.2
4.118	2-amino-2-methyl-1-propyl	imidazol-4-yl	60.35, 6.70, 25.60	435.2	437.2
4.119	2-hydroxycyklopent-1-yl	imidazol-4-yl	61.41, 6.30, 21.70	448.2	450.2
4.120	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	imidazol-4-yl	60.30, 6.39, 22.29	436.2	438.2
4.121	2,3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	57.30, 5.79, 22.25	438.2	440.2
4.121a	2(R),3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	57.32, 5.72, 22.28	438.2	440.2
4.121b	2(S),3-dihydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	57.31, 5.76, 22.20	438.2	440.2
4.122	2-(dimethylamino)ethyl	imidazol-4-yl	60.38, 6.69, 25.42	435.2	437.2
4.123	3-(dimethylamino)prop-1-yl	imidazol-4-yl	61.218, 6.98, 24.70	449.2	451.2
4.124	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	57.45, 6.21, 25.36	437.2	439.2
4.124a	3-amino-2(R)-hydroxy-1-propyl	imidazol-4-yl	57.46, 6.18, 25.35	437.2	439.2
4.125	2-(1-imidazolyl)ethyl	imidazol-4-yl	60.11, 5.65, 27.30	458.2	460.2
4.126	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	imidazol-4-yl	56.77, 5.50, 24.11	463.2	465.3
4.127	2-amino-cyklohexyl	imidazol-4-yl	62.15, 6.70, 24.05	461.2	463.2
4.128	methoxymethyl	imidazol-4-yl	58.60, 5.70, 23.75	408.2	410.2
4.129	2-(methylamino)ethyl	imidazol-4-yl	59.57, 6.43, 26.40	421.2	423.2
4.130	3-amino-cyklohexyl	imidazol-4-yl	62.22, 6.81, 24.06	461.2	463.2
4.131	4-amino-cyklohexyl	imidazol-4-yl	62.20, 6.72, 24.03	461.2	463.2
4.132	2-amino-3-hydroxypropyl	imidazol-4-yl	57.50, 6.03, 25.40	437.2	439.2
4.133	2-hydroxy-1-ethyl	pyrazin-2-yl	59.78, 5.60, 23.19	420.2	422.2
4.134	2-hydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	60.64, 5.85, 22.41	434.2	436.2



Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-II]	[M-III]
				a)	b)
4.134a	2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	60.62, 5.87, 22.40	434,2	436,2
4.135	3-hydroxy-2-butyl	pyrazin-2-yl	61.31, 6.15, 21.70	448,2	450,2
4.136	2-carbamoyl-1-ethyl	pyrazin-2-yl	58.84, 5.45, 24.81	447,2	449,2
4.137	carbamoylmethyl	pyrazin-2-yl	57.90, 5.20, 25.70	433,2	435,2
4.138	3-hydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	60.60, 5.80, 22.40	424,2	436,2
4.139	2-amino-1-ethyl	pyrazin-2-yl	59.91, 5.76, 26.55	419,2	421,2
4.140	2-ureido-1-ethyl	pyrazin-2-yl	56.84, 5.54, 27.11	462,2	464,3
4.141	2-acetylamino(ethyl)	pyrazin-2-yl	59.65, 5.65, 24.15	461,3	463,3
4.142	2-amino-2-methyl-1-propyl	pyrazin-2-yl	61.52, 6.31, 24.90	447,2	449,2
4.143	2-hydroxycyklopent-1-yl	pyrazin-2-yl	62.33, 5.95, 21.11	460,2	462,2
4.144	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	pyrazin-2-yl	61.38, 6.08, 21.70	448,2	450,2
4.145	2,3-dihydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	58.49, 5.59, 21.62	450,2	452,2
4.145a	2(R),3-dihydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	58.46, 5.52, 21.66	450,2	452,2
4.145b	2(S),3-dihydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	58.44, 5.63, 21.65	450,2	452,2
4.146	2-(dimethylamino)ethyl	pyrazin-2-yl	61.42, 6.26, 24.79	447,2	449,2
4.147	3-(dimethylamino)prop-1-yl	pyrazin-2-yl	62.22, 6.50, 24.10	461,2	463,2
4.148	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	58.60, 5.75, 24.66	449,2	451,2
4.148a	3-amino-2(R)-hydroxy-1-propyl	pyrazin-2-yl	58.59, 5.70, 24.68	449,2	451,2
4.149	2-(1-imidazolyl)ethyl	pyrazin-2-yl	61.03, 5.38, 26.63	470,3	472,3
4.150	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	pyrazin-2-yl	57.91, 5.10, 23.40	475,3	477,3
4.151	methoxymethyl	pyrazin-2-yl	59.82, 5.50, 23.19	420,2	422,2
4.152	2-(methylamino)ethyl	pyrazin-2-yl	60.68, 6.10, 25.56	433,2	435,2
4.153	3-amino-cyklohexyl	pyrazin-2-yl	63.17, 6.30, 23.49	473,2	475,2
4.154	4-amino-cyklohexyl	pyrazin-2-yl	63.20, 6.37, 23.55	473,2	475,2
4.155	2-amino-3-hydroxypropyl	pyrazin-2-yl	58.54, 5.82, 24.80	449,2	451,2
4.156	2-hydroxy-1-ethyl	furan-2-yl	61.52, 5.64, 17.05	408,2	410,2
4.157	2-hydroxy-1-propyl	furan-2-yl	62.30, 5.97, 16.34	422,2	424,2
4.158	3-hydroxy-2-butyl	furan-2-yl	63.02, 6.21, 15.86	436,2	438,2
4.159	2-amino-1-ethyl	furan-2-yl	61.68, 5.99, 20.37	407,2	409,2
4.160	2-ureido-1-ethyl	furan-2-yl	58.45, 5.57, 21.64	450,2	452,2
4.161	2-acetylamino(ethyl)	furan-2-yl	61.29, 5.80, 18.55	449,2	451,2
4.162	2-hydroxycyklopent-1-yl	furan-2-yl	64.08, 6.03, 15.41	448,2	450,2
4.163	2,3-dihydroxy-1-propyl	furan-2-yl	60.10, 5.84, 15.81	438,2	440,2
4.164	2-(dimethylamino)ethyl	furan-2-yl	63.28, 6.49, 19.10	435,2	437,2
4.165	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	furan-2-yl	60.16, 5.99, 19.03	437,2	439,2
4.166	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	furan-2-yl	58.60, 4.91, 18.52	449,2	451,2
4.167	2-(methylamino)ethyl	furan-2-yl	62.50, 6.30, 19.77	421,2	423,2
4.168	2-hydroxy-1-ethyl	thiofen-2-yl	59.07, 5.40, 16.31	424,2	426,2
4.169	2-hydroxy-1-propyl	thiofen-2-yl	60.05, 5.72, 15.87	438,2	440,2



Č.	SUBSTITUENT R ²	SUBSTITUENT R ¹	CHN ANALÝZA C[%], H[%], N[%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
				[M-III] a)	[M+III] b)
4.170	3-hydroxy-2-butyl	thiofen-2-yl	60.80, 6.01, 15.28	452.2	454.2
4.171	2-amino-1-ethyl	thiofen-2-yl	59.34, 5.59, 19.59	423.2	425.2
4.172	2-ureido-1-ethyl	thiofen-2-yl	56.42, 5.40, 20.88	466.2	468.2
4.173	2-acetylamino(ethyl)	thiofen-2-yl	59.11, 5.64, 17.91	465.2	467.2
4.174	2-hydroxycyklopent-1-yl	thiofen-2-yl	61.83, 5.82, 15.00	464.2	466.3
4.175	2,3-dihydroxy-1-propyl	thiofen-2-yl	57.96, 5.63, 15.27	454.2	456.2
4.176	2-(dimethylamino)ethyl	thiofen-2-yl	60.88, 6.26, 18.50	451.2	453.2
4.177	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	thiofen-2-yl	58.01, 5.75, 18.42	453.2	455.2
4.178	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	thiofen-2-yl	56.60, 4.70, 17.92	465.2	467.3
4.179	2-(methylamino)ethyl	thiofen-2-yl	60.17, 6.01, 19.06	437.2	439.2
4.180	2-hydroxy-1-ethyl	oxazol-2-yl	58.43, 5.42, 20.40	409.2	411.2
4.181	2-hydroxy-1-propyl	oxazol-2-yl	59.36, 5.67, 19.54	423.2	425.2
4.182	3-hydroxy-2-butyl	oxazol-2-yl	60.19, 5.91, 19.12	437.2	439.2
4.183	2-amino-1-ethyl	oxazol-2-yl	58.58, 5.61, 23.82	408.2	410.2
4.184	2-ureido-1-ethyl	oxazol-2-yl	55.68, 5.38, 24.47	451.2	453.2
4.185	2-acetylamino(ethyl)	oxazol-2-yl	58.32, 5.60, 21.62	450.2	452.2
4.186	2-hydroxycyklopent-1-yl	oxazol-2-yl	61.25, 5.85, 18.51	449.2	451.2
4.187	2,3-dihydroxy-1-propyl	oxazol-2-yl	57.13, 5.47, 18.88	439.2	441.2
4.188	2-(dimethylamino)ethyl	oxazol-2-yl	60.23, 6.23, 22.24	436.2	438.2
4.189	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	oxazol-2-yl	57.31, 5.70, 22.15	438.2	440.2
4.190	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	oxazol-2-yl	55.80, 4.60, 21.60	450.2	452.2
4.191	2-(methylamino)ethyl	oxazol-2-yl	59.53, 5.77, 23.06	422.2	424.2
4.192	2-hydroxy-1-ethyl	triazol-2-yl	55.48, 5.42, 27.01	409.2	411.2
4.193	2-hydroxy-1-propyl	triazol-2-yl	56.51, 5.72, 26.29	423.2	425.2
4.194	3-hydroxy-2-butyl	triazol-2-yl	57.48, 5.90, 25.32	437.2	439.2
4.195	2-amino-1-ethyl	triazol-2-yl	55.65, 5.62, 30.70	408.2	410.2
4.196	2-ureido-1-ethyl	triazol-2-yl	52.95, 5.30, 30.66	451.2	453.2
4.197	2-acetylamino(ethyl)	triazol-2-yl	55.77, 5.56, 27.81	450.2	452.2
4.198	2-hydroxycyklopent-1-yl	triazol-2-yl	58.58, 5.77, 24.83	449.2	451.2
4.199	2,3-dihydroxy-1-propyl	triazol-2-yl	54.43, 5.55, 25.41	439.2	441.2
4.200	2-(dimethylamino)ethyl	triazol-2-yl	57.54, 6.22, 28.70	436.2	438.2
4.201	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	triazol-2-yl	54.49, 5.70, 28.58	438.2	440.2
4.202	(oxazolidin-2-on-5-yl)methyl	triazol-2-yl	53.17, 4.70, 27.77	450.2	452.2
4.203	2-(methylamino)ethyl	triazol-2-yl	56.64, 5.95, 29.53	422.2	424.2

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

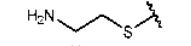
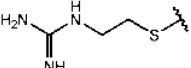
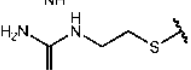
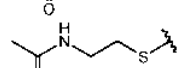
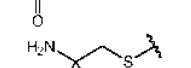
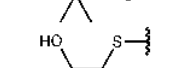

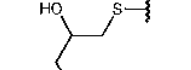
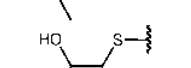

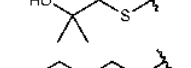
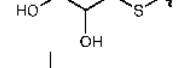
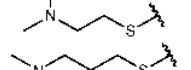
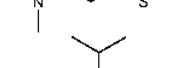
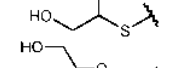
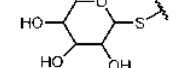
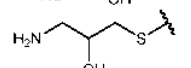
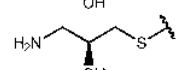
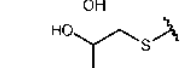
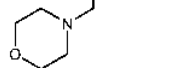
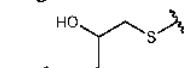
b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

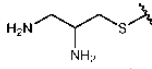
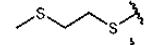
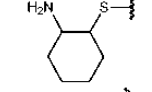
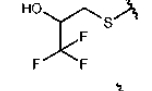
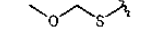
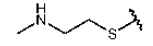
- 5 Příklad 2. Antiproliferační aktivita nových sloučenin v lymfomových buněčných liniích Jednou ze schopností sloučeniny s antilymfoblastickou aktivitou je cytotoxicita. Testování cytotoxicity bývá nej častěji založeno na sledování metabolické aktivity živých buněk. Nej častěji používané metody pro kvantifikaci buněčné proliferace a cytotoxicity využívají (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid (MTT) nebo Calcein AM. Tyto metody jsou využívány pro screening nových sloučenin nebo při testování chemosensitivity. Tyto metody detekují pouze živé buňky, neboť jen tyto jsou schopné redukovat MTT na odpovídající formazan. Množství redukování MTT a vzniklého formazanu pak odpovídá počtu živých buněk v kultuře.

Sloučeniny byly testovány s následujícími buněčnými liniemi lymfomů: HT (difuzní velkobuněčný B-lymfom), OCI-LY2 (difuzní velkobuněčný B-lymfom), MINO (lymfom z plášťových buněk). Tyto linie byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI obsahujícím 10 % fetálního séra, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml) při 37 °C v atmosféře doplněné 5% CO₂. Pro testování cytotoxicity byly buňky vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 5000-10000 buněk na jamku a po 8 hodinách byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích od 100 to 0.01 µM vždy v triplicátu. Po třech dnech byl k buňkám přidán roztok MTT (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA) a po 5 hodinách bylo médium nahrazeno DMSO. Absorbance byla měřena destičkovým readerem při 620 nm. Měření cytotoxicity pomocí MTT bylo zopakováno třikrát a jako negativní kontrola byly použity neovlivněné buňky. Hodnoty IC₅₀ stanovující koncentraci látky, která je letální pro 50 % nádorových buněk, byly odečteny z křivek závislosti buněčné viability na koncentraci testované látky.

15 Tabulka 2. Antilymfomová aktivita některých nových sloučenin *in vitro*.

Číslo látky	substituent R (=R ² -S-)	Buněčné linie lymfomu GI ₅₀ (µM)		
		HT	OCI-LY2	MINO
4.1		0.048	0.050	0.040
4.2		1.005	0.858	0.923
4.3		0.062	0.152	0.081
4.5		0.255	0.181	0.119
4.6		0.120	0.084	0.081
4.7		0.192	0.163	0.197
4.8		0.109	0.102	0.089

4.9		0.040	0.046	0.029
4.10		0.39	0.812	0.39
4.11		0.240	0.198	0.136
4.12		0.071	0.054	0.042
4.13		0.085	0.100	0.064
4.14		0.636	0.680	0.530
4.15		0.273	0.280	0.427
4.16		0.567	0.373	0.450
4.17		0.507	0.610	0.477
4.18		0.021	0.022	0.010
4.19		0.054	0.061	0.093
4.20		0.105	0.109	0.076
4.21		0.980	1.001	1.307
4.22		8.073	25.205	21.609
4.23		0.055	0.055	0.064
4.23a		0.063	0.099	0.051
4.24		0.200	0.200	0.243
4.25		0.332	0.435	0.767
4.26		0.155	0.145	0.135
4.27		0.120	0.151	0.156
4.28		0.080	0.053	0.069

4.29		0.480	0.780	0.770
4.30		0.975	0.668	0.773
4.31		0.139	0.136	0.157
4.32		0.690	0.585	0.641
4.33		0.340	0.285	0.243
4.34		0.056	0.092	0.040

Příklad 3. CDK inhibiční aktivity nových 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů

5

Kinázy CDK2/cyklin E a CDK1/Cyclin B byly připravena pomocí bakulovirové infekce v hmyzích buňkách Sf9 a purifikována na koloně Ni²⁺+NTA (Qiagen). Reakce probíhala za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 a 15 μM ATP, 0.05 μCi [γ-³³P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 μl v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 μM MnCl₂, 3 μM Na-orthovanadát, 1.2 mM DTT, 2,5 μg / 50 μl PEG_{20.000}).

10

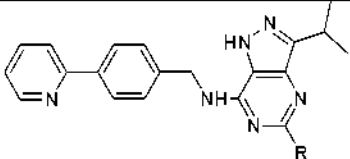

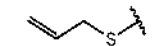
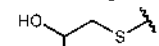
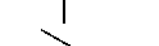
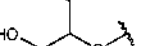


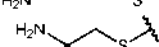


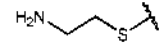
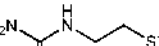

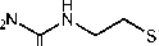
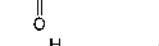
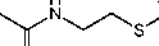



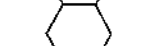
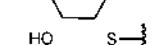
CDK4/Cyclin D1, CDK5/p35NCK, CDK7/Cyclin H/ MAT1 a CDK9/Cyclin T1 byly zakoupeny od společnosti ProKinase GmbH. Reakce probíhaly za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 (pro CDK1/2/5) nebo (YSPTSPS)₂ KK peptidu (pro CDK7/CDK9) nebo RPPTLSPIPHIPR peptidu (pro CDK4) a v přítomnosti 15/15/15/0.15/1.5/1.5 μM ATP (pro CDK1/2/4/5/7/9), 0.05 μCi [γ-³³P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 μl v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μM Na-orthovanadát, 1.2 mM DTT, 2,5 μg / 50 μl PEG_{20.000}).

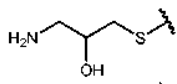
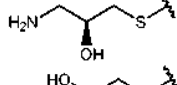
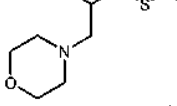
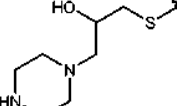
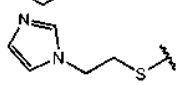
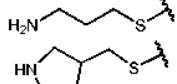
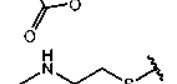
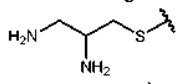
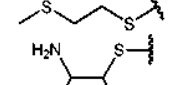
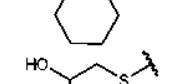
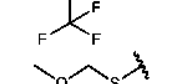
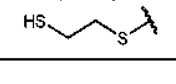
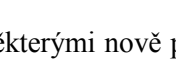
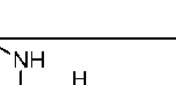
15

Reakce byly zastaveny přidáním 5 μl 3% vodného roztoku H₃PO₄. Vzorokly byly naneseny na P-81 fosfoceluloseovou membránu (Whatman), která byla následně 3x promyta 0,5% vodným roztokem H₃PO₄ a usušena na vzduchu. Kinázová inhibice byla stanovena za pomoci digitálního analyzátoru obrazu FLA-7000 (GE Healthcare Life Sciences) a byla vyjádřena jako reziduální kinázová aktivita nebo jako hodnota IC₅₀ udávající koncentraci testované látky způsobující snížení aktivity CDK na 50 %.

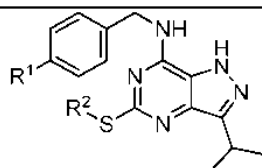
25

Tabulka 3. Inhibice komplexu CDK2/E některými nově připravenými sloučeninami je vyjádřena jako IC₅₀.

		
Číslo látky	substituent R (=R ² -S-)	Inhibice enzymu IC ₅₀ (μM)
4.1		0.003
4.2		0.100
4.3		0.012
4.5		0.15
4.6		0.019
4.7		0.027
4.8		0.021
4.9		0.004
4.10		0.030
4.11		0.018
4.12		0.041
4.13		0.020
4.14		0.134
4.15		0.039
4.16		0.052
4.17		0.030
4.18		0.010
4.19		0.077
4.20		0.099
4.21		0.077
4.22		0.363

4.23		0.031
4.23a		0.011
4.24		0.156
4.25		0.171
4.26		0.032
4.27		0.022
4.28		0.019
4.34		0.013
4.29		0.012
4.30		0.138
4.31		0.052
4.32		0.132
4.33		0.059
4.35		0.32

5 Tabulka 4. Inhibice komplexu CDK2/E některými nově připravenými sloučeninami je vyjádřena jako IC₅₀.



Číslo látky	Substituent R2	Substituent R1	CDK2/E inhibice IC ₅₀ (μM)
4.50	2-hydroxyethyl	imidazol-1-yl	0.010
4.57	2-aminoethyl	imidazol-1-yl	0.005
4.80	2-hydroxyethyl	pyrazol-1-yl	0.003
4.81	2-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	0.037
4.90	2-amino-2-methyl-1-propyl	pyrazol-1-yl	0.011
4.91	2-hydroxy-1-butyl	pyrazol-1-yl	0.025
4.93	2-hydroxy-2-methyl-1-propyl	pyrazol-1-yl	0.008

4.94	2,3-dihydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	0.006
4.95	2-(dimethylamino)ethyl	pyrazol-1-yl	0.043
4.96	3-(dimethylamino)prop-1-yl	pyrazol-1-yl	0.060
4.97	3-amino-2-hydroxy-1-propyl	pyrazol-1-yl	0.006
4.109	2-hydroxyethyl	imidazol-4-yl	0.005
4.133	2-hydroxy-1-ethyl	pyrazine-2-yl	0.006
4.139	2-amino-1-ethyl	pyrazine-2-yl	0.004

5 Tabulka 5. Kinázová inhibiční aktivita sloučeniny **4.9** na širším panelu CDKs. Jako referenční látka pro porovnání účinnosti známá v prior arts je uvedena sloučenina CR8 ((2S)-2-[[9-propan-2-yl-6-[(4-pyridin-2-ylphenyl)methylamino] purin-2-yl] amino] butan-1-ol).

Kinázy	IC ₅₀ (μM)*	
	Slouč. 4.9	CR8
CDK1	0.090 ± 0.012	0.787 ± 0.100
CDK2	0.005 ± 0.001	0.062 ± 0.026
CDK4	0.603 ± 0.318	26.09
CDK5	0.015 ± 0.003	0.225 ± 0.013
CDK7	0.124 ± 0.007	1.769 ± 0.013
CDK9	0.025 ± 0.002	0.272 ± 0.038

* testováno v nejméně duplikátech

10

Příklad 4. Nové sloučeniny ovlivňují buněčný cyklus lymfomů

Subkonfluentní buňky byly ovlivněny různými koncentracemi nových sloučenin po dobu 24 hod. 30 min před ukončením inkubace byly buňky naznačeny pulsem 10 μM 5-brom-2'-deoxyuridinu. Buňky byly poté opláchnuty PBS, fixovány 70% ethanolom a denaturovány 2 M HCl. Po neutralizaci byla provedena inkubace s fluorescenčně značenou protilátkou proti anti-BrdU, buňky byly opět promyty, nabarveny propidiumjodidem a analyzovány průtokovým citometrem se 488 nm laserem.

15

20 Jak je ukázáno níže, látka **4.9** v nanomolárních koncentracích snižuje množství aktivně proliferujících buněk (BrdU pozitivní populace) v linii MINO a UPF1H a jejím působením dochází k akumulaci buněk v G1 a G2/M fázi buněčného cyklu. Dále byl pozorován koncentračně závislý nárůst subG1 populace buněk, označované jako apoptotické.

25 Příklad 5. Nové sloučeniny aktivují v buňkách lymfomů kaspázy 3 a 7

Stanovení proapoptotických vlastností nových sloučenin bylo založeno na kvantifikaci enzymatické aktivity kaspázy-3/7. Při tomto experimentu byly buňky ovlivněné látkami sklizeny centrifugací a homogenizovány v extrakčním pufru (10 mM KCl, 5 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2% CHAPS, inhibitory proteas, pH 7,4) po dobu 20 minut na ledu. Poté byly vzorky centrifugovány při 10000 g a 4 °C po dobu 20 minut. Pomocí metody dle Bradfordové byla stanovena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích a srovnána na stejnou hladinu. Lyzáty byly poté inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 hodin v reakčním pufru (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,3) obsahujícím 100 μM substrát Ac-DEVD-AMC (Sigma-Aldrich). Fluorescence vzniklého produktu byla změřena pomocí přístroje Fluorskan Ascent microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland) při 346 nm/442 nm (ex/em).

35

Fluorimetrický test aktivity kaspázy 3 a 7 nám ukázal silnou proapoptotickou aktivitu látky 4.9 v

lymfomových buňkách MINO a UPF1H po 24 h působení. Nárůst aktivity se projevil již při nanomolárních koncentracích a navíc vykazoval koncentrační závislost.

Příklad 6. Nové sloučeniny aktivují apoptózu v nádorových buňkách lymfomů

5

Účinek látky 4.9 na aktivaci apoptózy byl dále ověřen studiem exprese vybraných apoptotických proteinů pomocí metody imunoblottingu. Buňky byly sklizeny, třikrát promyty vychlazeným PBS a zlyzovány v extrakčním pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P40) obsahujícím směs inhibitorů proteas a fosfatas (Sigma-Aldrich, USA). 20 µg celkových proteinů bylo separováno pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS- PAGE) a následně přeneseno na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly blokovány v roztoku PBS s 0,1% Tweenem 20 obsahujícím 5 % sušeného mléka a inkubovány přes noc se specifickými protilátkami.

10

Specifické protilátky byly koupeny od firmy Sigma Aldrich (anti-Bcl-2), Santa Cruz Biotechnology (anti-Mcl-1, clone S-19; anti-PARP, clone F-2; anti-myc) a Cell Signaling (anti-caspáza-7; anti-caspáza-3, clone 3G2; anti-XIAP, anti-Bcl-xl). Všechny primární protilátky byly naředěny do blokovacího roztoku. Jako sekundární byly použity protilátky konjugované s peroxidasou (králičí protilátka proti myším imunoglobulinům a prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům; DAKO, Denmark), které byly vizualizovány pomocí reagensů ECL (GE-Healthcare Life Sciences).

15

Výsledky analýz imunoblotů některých proteinů zapojených do apoptotického způsobu smrti je ukázáno na obrázku 4. Sledování štěpení proteinu PARP-1, jaderného cíle caspasy-3, potvrdilo výše zmíněné výsledky. Výrazný nárůst hladiny 89-kDa fragmentu proteinu PARP-1 byl zejména patrný po ovlivnění látkou 4.9 v nádorových liniích MINO a to jak v koncentračním, tak časovém experimentu. Aktivace apoptózy byla dále studována pomocí exprese anti-apoptotických proteinů Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xl. Zatímco hladiny proteinů Bcl-2 a Bcl-xl zůstaly nezměněny, exprese proteinu Mcl-1 klesala a to díky tomu, že patří mezi proteiny s nízkým poločasem rozpadu a jeho stabilita je vysoce závislá na buněčné transkripci.

25

30

Příklad 7. Nové 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny inhibují buněčnou transkripci redukcí fosforylace RNA polymerasy II

35

V lymfomové linii MINO ovlivněné látkou 4.9 byla sledována hladina fosforylace RNA polymerasy II, která je substrátem CDK7 a CDK9. Pro analýzu byla použita metoda imunoblottingu popsaná v předchozích příkladech s využitím následujících specifických protilátek: anti-fosfo RNA polymeráza II (S5) (Bethyl Laboratories, USA), anti-fosfo RNA polymeráza II (S2) (Bethyl Laboratories, USA), anti-RNA polymeráza II (klon ARNA-3, Millipore) a β-aktin (klon C4, Santa Cruz Biotechnology, USA).

40

Analýza odhalila pokles fosforylace serinu 2 a serinu 5 RNA polymerasy II v buněčné linii MINO jak po 24h působení látky 4.9 v různých koncentracích, tak i po působení 12,5 nM 4.9 v různých časových intervalech. Tento výsledek potvrzuje inhibici CDK7 a CDK9 na buněčné úrovni. Inhibice buněčné transkripce byla navíc potvrzena i sníženou hladinou anti-apoptotického proteinu Mcl-1 (viz výše), který patří do skupiny proteinů s krátkým poločasem rozpadu.

45

Příklad 8. Antilymfomová aktivita nové generace 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinů *in vivo*

50

Imunodeficientní myši NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (Jackson Laboratory) byly chovány v oddělených klecích. Lymfomové buňky MINO byly injektovány podkožně (s.c.; 7 mil / myš) do 8-12 týdnů starých myší (samice). Terapie látkou 4.9 rozpuštěné v PBS probíhala denně pomocí intravenózního podání. Potlačení růstu nádorů bylo stanoveno každý den a bylo porovnáváno s neléčenou kontrolou. V dalším experimentu bylo porovnáváno přežití myší po

55

intraperitoneálním podání látky 4.9 v porovnání s kontrolní skupinou. V posledním experimentu byly myši léčeny látkou 4.9 v různých dávkách (5 a 10 mg/kg) po 24 hodinách usmrceny, nádory byly vyoperovány a byla analyzována exprese proteinů pomocí imunoblottingu (popsáno výše). Specifické protilátky byly koupeny od firmy Bethyl Laboratories, USA (anti-phospho RNA polymerase II S2 and S5), Millipore (anti-RNA polymerase II, clone ARNA-3), Santa Cruz Biotechnology (anti-Mcl-1, clone S-19; anti-PARP, clone F-2) and Cell Signaling (anti-Rb, clone 4H1; anti-pRb antibodies; anti-caspase-7; anti-caspase-3, clone 3G2; anti-caspase-7; anti-XIAP, anti-Bcl-xl, anti-Bid, anti-Bax) nebo Sigma Aldrich (anti-Bcl-2; anti-tubulin).

Jak je ukázáno na obrázku 5, látka 4.9 (intravenózní podání) signifikantně potlačuje růst nádorů během 15 dní v porovnání s kontrolní skupinou myší. Při porovnání různého dávkování při intraperitoneálním dávkování látky 4.9 je zřejmé, že optimální dávkování 4.9 je 5mg/kg 1x týdně, které jednoznačně prodlužuje přežití léčených myší. Analýzou obsahu nádorů bylo zjištěno, že látka 4.9 v dávce 10 mg/kg aktivuje apoptosu v nádorech (dokumentováno především sledováním štěpeného proteinu PARP a kaspasovými fragmenty) a zároveň redukuje fosforylaci retinoblastomového proteinu na více fosfo-místech, což prokazuje inhibici CDKs. Inhibice transkripčních CDKs byla potvrzena poklesem fosforylací RNA polymerasy II, která se projevila i na poklesu exprese proteinu Mcl-1, který řadíme mezi antiapoptotické proteiny s krátkým poločasem rozpadu.

Příklad 9. Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
Pšeničný škrob	120 g
Magnesium stearát	80 g
Laktosa	20 g

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

Příklad 10. Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., 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.

Příklad 11. Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím

postupem:

Složení

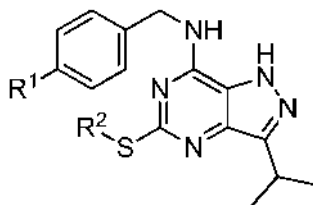
5	Aktivní složka	250 g
	PEG 400	1 litr
	Tween 80	1 litr

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

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I



I

ve kterém,

25 **R¹** je fenyl nebo heteroaryl s pěti až šesti atomy v kruhu, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; přičemž fenyl nebo heteroaryl může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny Cl, F, CF₃, NH₂, OH, NO₂, OCH₃, OCF₃;

30 **R²** je vybráno ze skupiny zahrnující:

- C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl, který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

35

- C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkenyl, který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

40

- C₃-C₆ cykloalkyl, kde cykloalkyl obsahuje 3 až 6 uhlíkových atomů, a je substituován alespoň jedním z těchto substituentů: hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

45

- lineární nebo rozvětvený heteroalkyl obsahující 2 až 6 atomů, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino,

karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino;

- 5 - cykloheteroalkyl obsahující 3 až 6 atomů, z nichž je alespoň jeden heteroatom vybraný ze skupiny O, S, N a ostatní jsou uhlíkové atomy; který může být případně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny hydroxy, amino, karbamoyl, =O, guanidino, ureido, trifluormethyl, sulfonyl, dimethylamino, diethylamino, methylamino, ethylamino, C1-C2-acylamino, C1-C4 alkyl;
- 10 - cykloheteroalkyl-methyl, cykloheteroalkyl-ethyl nebo cykloheteroalkyl-propyl, přičemž cykloheteroalkyl je skupina popsána výše;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s kyselinami.

- 15 2. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1, kde R^1 je vybrán ze skupiny sestávající ze substituentů fenylyl, pyridin-2-yl, pyridin-3-yl, pyridin-4-yl, pyrimidin-2-yl, pyrimidin-4-yl, pyrimidin-5-yl, pyrazin-2-yl, pyridazin-3-yl, pyridazin-4-yl, pyrrol-1-yl, pyrrol-2-yl, pyrrol-3-yl, pyrazol-1-yl, pyrazol-3-yl, pyrazol-4-yl, imidazol-1-yl, imidazol-2-yl, imidazol-4-yl, furan-2-yl, furan-3-yl, thien-2-yl, thien-
20 3-yl, oxazol-2-yl, thiazol-2-yl, tetrazol-5-yl; přičemž tyto substituenty mohou být nesubstituované nebo substituované jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny Cl, F, CF₃, NH₂, OH, NO₂, OCH₃, OCF₃.

- 25 3. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R^2 je hydroxy-substituovaný C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený C₂-C₅ alkyl substituovaný jednou nebo dvěma hydroxy skupinami; s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethyl, 2-(RS, R or S)-hydroxypropyl, 3-hydroxypropyl, 2-hydroxybutyl, 1-hydroxybut-2-yl, 2-hydroxybut-2-yl, 1-hydroxy-3-methylbut-2-yl, 4-hydroxybut-2-(RS, R, or S)-yl, 2-hydroxy-2-methylpropyl, 3-hydroxy-3-methylbut-2-yl, (RS,R or S)-2,3-dihydroxypropyl, 1-hydroxy-3-methylbut-2-yl, and (3RS)-2-hydroxypent-3-yl.

- 35 4. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R^2 je C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný jednou nebo dvěma amino skupinami, popřípadě je aminoskupina dále substituována; s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující: 2-aminoethyl, 3-aminopropyl, 4-aminobutyl, 5-aminopentyl, 6-aminohexyl, 2,3-diaminopropyl, (R)-2,3-diaminopropyl, (S)-2,3-diaminopropyl, 2-guanidinoethyl, and 2-ureidoethyl, 2-(acetylaminomethyl), (dimethylamino)methyl, 2-(dimethylamino)ethyl, 3-(dimethylamino)propyl, 3-(dimethylamino)butyl, (diethylamino)methyl, 2-(diethylamino)ethyl, 3-(diethylamino)propyl a 4-(diethylamino)butyl.

- 40 5. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R^2 je vybrán ze skupiny zahrnující

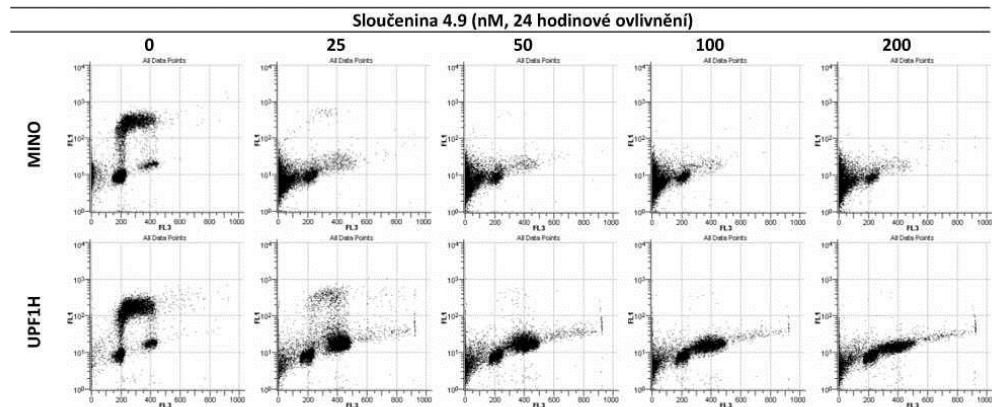
45 - C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný karbamoylovou skupinou; s výhodou je substituent vybrán ze skupiny zahrnující (karbamoyl)methyl, 2-(karbamoyl)ethyl, 3-(karbamoyl)propyl;

50 - lineární nebo rozvětvený heteroalkyl obsahující 2 až 6 atomů, z nichž je alespoň jeden heteroatom O nebo S; s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující methoxymethyl, ethoxymethyl, 2-(methylthio)ethyl;

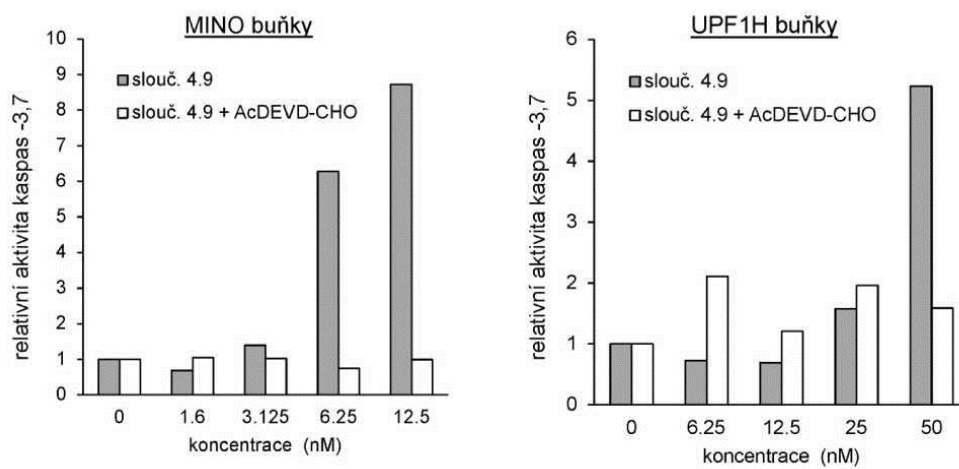
55 - C₂-C₃ lineární alkyl substituovaný jednou nebo dvěma sulfanylovými skupinami, nebo kombinací sulfanylové a hydroxyskupiny. S výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující 2-sulfanylethyl, 3-hydroxy-2-sulfanylpropyl, a 2-hydroxy-3-sulfanylpropyl.

6. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R² je C₂-C₆ lineární nebo rozvětvený alkyl zároveň substituovaný amino a hydroxy skupinou; s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující 3-amino-2-hydroxypropyl, (R)-3-amino-2-hydroxypropyl, and (S)-3-amino-2-hydroxypropyl, 2-amino-3-hydroxypropyl, (R)-2-amino-3-hydroxypropyl, and (S)-2-amino-3-hydroxypropyl.
7. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R² je
- 10 - C₃-C₆ cykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl a cyklohexyl;
- C₃-C₆ cykloalkyl substituovaný amino nebo hydroxy skupinou, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující: trans-4-aminocyklohexyl, cis-4-aminocyklohexyl, cis,trans--4-aminocyklohexyl, cis--2-aminocyklohexyl, trans--2-aminocyklohexyl, cis,trans--2-aminocyklohexyl, 3-aminocyklohexyl, trans- hydroxycyklohexyl, cis-4-hydroxycyklohexyl, cis,trans-4-hydroxycyklohexyl, cis-2-hydroxycyklohexyl, trans-2-hydroxycyklohexyl, cis,trans-2-hydroxycyklohexyl, 3- hydroxycyklohexyl.
8. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2, kde R² je cykloheteroalkyl, cykloheteroalkyl-methyl, cykloheteroalkyl-ethyl nebo cykloheteroalkyl-propyl obsahující dusík nebo kyslík nebo oba heteroatomy; s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující: N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl, (aziridin-1-yl)ethyl, (azetidín-1-yl)ethyl, (azolidin-1-yl)ethyl, (piperidin-1-yl)ethyl, (aziridin-1-yl)propyl, (azetidín-1-yl)propyl, (azolidin-1-yl)propyl a (piperidin-1-yl)propyl, 2-oxazolidon-5-yl.
9. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro použití jako léčiva.
10. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 pro použití pro léčbu krévních hyperproliferativních onemocnění.
11. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 pro použití pro léčbu Non-Hodgkinových lymfomů.
12. 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 pro použití pro inhibici kináz při léčbě Non-Hodgkinových lymfomů.
13. Farmaceutický přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden 5-alkylthio-7-[(4-arylbenzyl)amino]-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič.

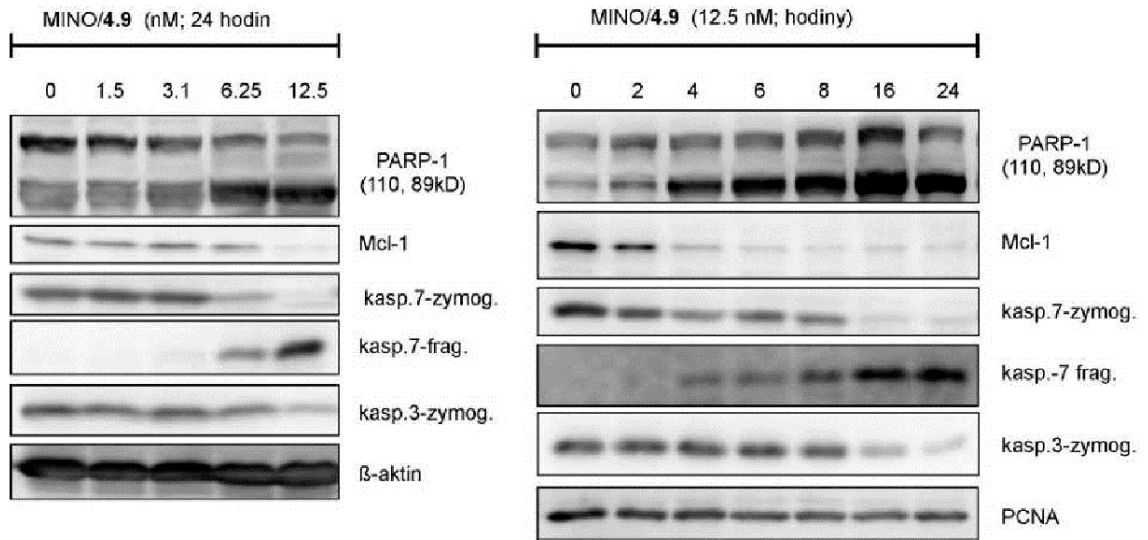
5 výkresů



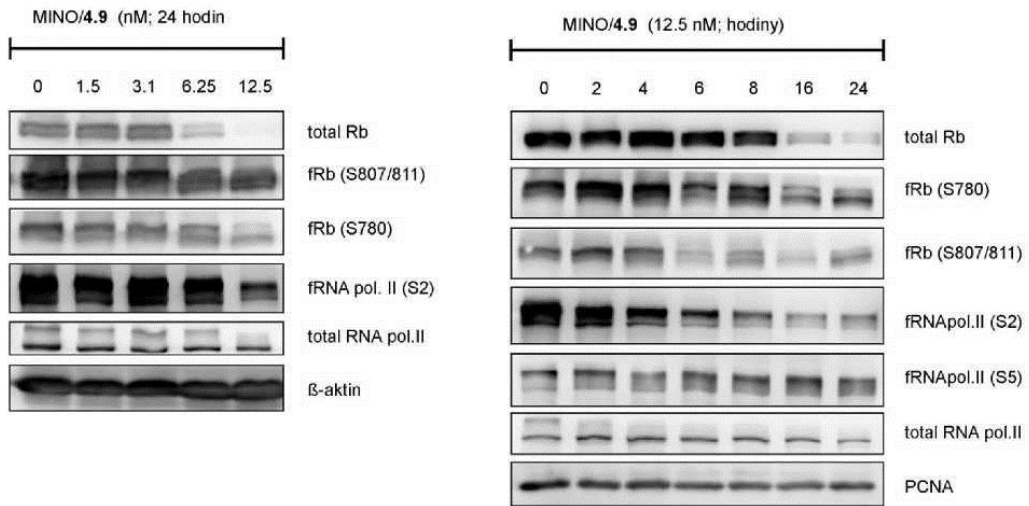
Obr. 1



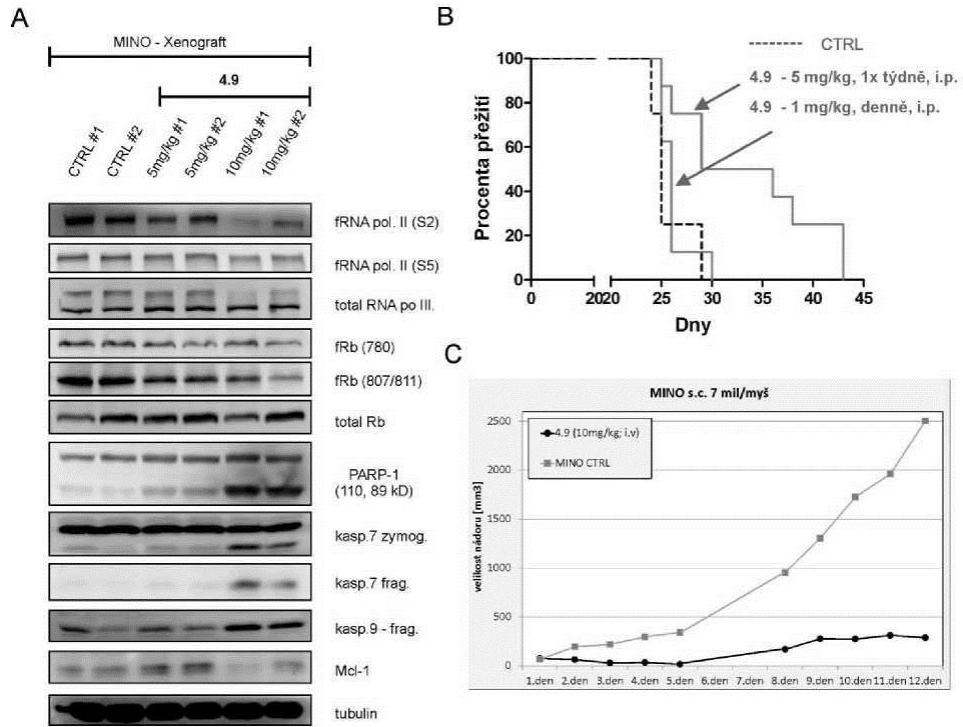
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5