

C07D 473/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

 (19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA

 ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

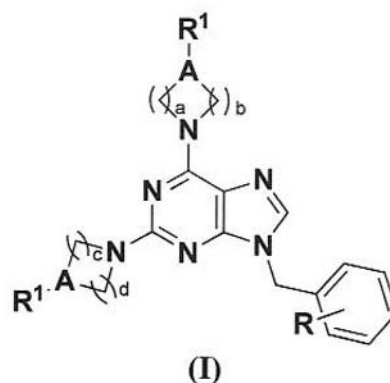
(21) Číslo přihlášky: **2019-82**
 (22) Přihlášeno: **12.02.2019**
 (40) Zveřejněno: **19.08.2020**
(Věstník č. 34/2020)
 (47) Uděleno: **14.04.2021**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **26.05.2021**
(Věstník č. 21/2021)

(56) Relevantní dokumenty:
 FIORINI, Maria T.; ABELL, Chris. Solution-phase synthesis of 2,6,9-trisubstituted purines. Tetrahedron letters, 1998, 39.13: 1827-1830; ISSN: 0040-4039; HUANG, He, et al. Microwave-assisted rapid synthesis of 2,6,9-substituted purines. Journal of combinatorial chemistry, 2007, 9.2: 197-199; ISSN: 1520-4766; HUANG, He, et al. Discovery of novel purine derivatives with potent and selective inhibitory activity against c-Src tyrosine kinase. Bioorganic & medicinal chemistry, 2010, 18.13: 4615-4624; ISSN: 0968-0896.
 WO 2012/104776 A1; WO 2013/061305 A1; WO 2015/137887 A1.

(73) Majitel patentu:
 Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
 Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Nová
 Ulice, CZ

(72) Původce:
 Gabriel Gonzales, Vrbátky, CZ
 Václav Mik, Grygov, CZ
 Noemi Bucharová, Vysokov, CZ
 Jiří Grúz, Bohuňovice, CZ
 Petr Kaňovský, Vranov, CZ
 Miroslav Strnad, Olomouc, Neředín, CZ

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



(54) Název vynálezu:
**Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu,
 farmaceutické přípravky obsahující tyto
 deriváty a jejich použití při neuroprotektci**

(57) Anotace:
 Řešení se týká heterocyklických derivátů purinu vzorce I, se substituenty obsahujícími dusík, jejich použití v lékařských aplikacích a přípravků obsahujících tyto deriváty. Nová generace sloučenin má selektivní antineurodegenerativní vlastnosti na nervových buňkách a tkáních a může být s výhodou použita při léčení a profylaxi neurodegenerativních onemocnění, zejména pak při léčení a profylaxi Parkinsonovy choroby.

Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu, farmaceutické přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití při neuroprotekcí

5 Oblast techniky

Vynález se týká heterocyklických sloučenin odvozených od purinu, se substituenty obsahujícími dusík, jejich použití pro neuroprotekcí a zejména léčení Parkinsonovy choroby a farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny.

10

Dosavadní stav techniky

Výskyt neurodegenerativních onemocnění zaznamenal dramatický nárůst. Zvláště výskyt onemocnění, jako je Alzheimerova choroba (AD), se v populaci ve věku nad 65 let zdvojnásobuje. Kromě toho AD postihuje až 50 % populace ve věku nad 85 let (Qiu, Kivipelto and von Strauss et al., Dial Clin Neurosci, 2009, 11, 111).

15

Podobně také Parkinsonova choroba (PD), amyotrofická laterální skleróza (ALS), progresivní supranukleární paralýza (PSP), kortikobazální degenerace (CBD), frontotemporální demence (FTD), demence s Lewyho tělísky (DLB), Huntingtonova choroba (HD), multisystémová atrofie (MSA), chronická traumatická encefalopatie (CTE), spinocerebelární ataxie jsou spojeny se stárnutím populace. Neurodegenerativní onemocnění jsou v současné době palčivým problémem moderní společnosti, kvůli vzrůstající incidenci a nákladům spojených s léčbou a nedostatkem účinných léků (Christophe Coupé et al., Eur Neurol Rev, 2013, 8, 38; Levy et al., Arch Neurol, 2007, 64, 1242; Shah et al., Lancet Neurol, 2016, 15, 1285). Neurodegenerativní onemocnění jsou úzce spojena s několika patologickými ději, jako jsou progresivní ztráta funkce neuronů vedoucí k jejich apoptotické smrti, porucha autofagie, agregace proteinů, zvýšená zánětlivost, oxidativní stres, mitochondriální dysfunkce a excitotoxicita (Jeffrey, L. C.; Jagan, A. P.; (2016). Neurodegenerative Diseases Evolving Unifying Principles In Neurodegenerative Diseases Unifying Principles (pp. 1-14). Oxford, UK).

20

25

30

V současné době se terapeutické trendy neurodegenerativních onemocnění zaměřují na terapii modifikující onemocnění, která se zaměřuje na patologické mechanismy onemocnění, které vedou k progresi a smrti neuronů. Současné strategie terapie zahrnují 1) přímé účinky na neurony prostřednictvím snížení oxidativního stresu a indukce dráhy Nrf-2, zvýšení mitochondriální vitality, snížení apoptózy (indukce Akt dráhy, Bcl-2 up-regulace), ochranu axonů a jejich funkcí, a tvorbu trofických faktorů; nebo 2) nepřímé účinky regulace buněk odpovědných za zánětlivé procesy, jako je mikroglie a astrocyty. Konečným výsledkem terapie modifikující onemocnění je dosažení neuroprotekcí (Cummins et al., Transl Neurodegen, 2017, 6, 25).

35

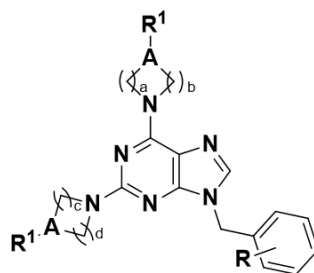
40

Proto je předmětem tohoto vynálezu poskytnout novou generaci derivátů purinu, které vykazují silné a selektivní antineurodegenerativní vlastnosti na nervových buňkách a tkáních a mohou být s výhodou použity při léčení a profylaxi neurodegenerativních onemocnění, mimořádně výhodně pak Parkinsonovy choroby.

45

Podstata vynálezu

50 Předmětem tohoto vynálezu jsou C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty obecného vzorce I,



(I)

ve kterém

5

R je vybráno ze skupiny zahrnující H, F, Cl, Br, methyl, OH a methoxy;

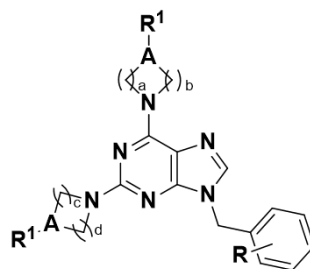
10 kruh $-\text{N}-(\text{CH}_2)_c-\text{A}(\text{R}1)-(\text{CH}_2)_d-$ v poloze 2 je vybráný ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, thiomorfolín-yl, piperazín-1-yl, 4-methylpiperazín-1-yl, azepán-1-yl, azokán-1-yl, 1,5-oxazokán-5-yl a 1,5-thiazokán-5-yl;

15 kruh $-\text{N}-(\text{CH}_2)_a-\text{A}(\text{R}1)-(\text{CH}_2)_b-$ v poloze 6 je vybráný ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, thiomorfolín-yl, piperazín-1-yl, 4-methylpiperazín-1-yl, azepán-1-yl, azokán-1-yl, 1,5-oxazokán-5-yl a 1,5-thiazokán-5-yl;

15

a jejich farmaceuticky přijatelné soli, zejména soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami.

20 Předmětem tohoto vynálezu jsou C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty obecného vzorce Ia,



(Ia)

25 ve kterém

R je vybráno ze skupiny zahrnující H, F, Cl, Br, methyl, OH a methoxy;

30 kruh $-\text{N}-(\text{CH}_2)_c-\text{A}(\text{R}1)-(\text{CH}_2)_d-$ v poloze 2 je vybráný ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, morfolín-yl, thiomorfolín-yl, piperazín-1-yl, 4-methylpiperazín-1-yl, azepán-1-yl, azokán-1-yl, 1,5-oxazokán-5-yl a 1,5-thiazokán-5-yl;

35 kruh $-\text{N}-(\text{CH}_2)_a-\text{A}(\text{R}1)-(\text{CH}_2)_b-$ v poloze 6 je vybráný ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, morfolín-yl, thiomorfolín-yl, piperazín-1-yl, 4-methylpiperazín-1-yl, azepán-1-yl, azokán-1-yl, 1,5-oxazokán-5-yl a 1,5-thiazokán-5-yl;

35

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami.

pro použití pro léčení nebo profylaxi neurodegenerativních onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující amyotrofickou laterální sklerózu, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzu, kortikobazální degenerace, frontotemporální demence, Lewyho tělní demence, atrofie mnohočetného systému, chronické traumatické encefalopatie a spinocerebelární ataxie.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou dále C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty obecného vzorce I nesoucí substituent v poloze 9, tedy substituent $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{R}$, který je vybrán ze skupiny zahrnující benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl.

Jednotlivé sloučeniny popsané v příkladech představují jednotlivá výhodná provedení předloženého vynálezu. Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou tyto C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty obecného vzorce I:

-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(azetidin-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(pyrrolidin-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(piperidin-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-morfolino-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-thiomorfolino-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin; 2-(azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9H-purin.

methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-
 hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9*H*-purin; 2-(azetidín-1-
 yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-
 5 yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(azepan-1-yl)-9-(benzyl, 2-
 fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-
 dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-
 methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-
 methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9*H*-purin; 2-(azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl,
 10 morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-
 oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(azokan-1-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-
 fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-
 brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl,
 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9*H*-
 15 purin; 2-(azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-
 methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(1,5-
 oxazokan-5-yl)-9-(benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-
 chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-
 methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-
 hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9*H*-purin; 2-(azetidín-1-
 20 yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, morfolino, thiomorfolino, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-
 yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl, 1,5-thiazokan-5-yl)-6-(1,5-thiazokan-1-yl)-9-
 (benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl,
 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl,
 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-
 25 methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl)-9*H*-purin.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou tyto C2,C6-disubstituované-9-benzyl-
 9*H*-purinové deriváty obecného vzorce I: 2,6-di(azetidín-1-yl)-9-(3-hydroxybenzyl)-9*H*-purin,
 2,6-di(azetidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-9*H*-purin, 9-(4-hydroxybenzyl)-2,6-di(pyrrolidín-1-
 30 yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-2-(piperidín-1-yl)-6-(pyrrolidín-1-yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-6-(piperidín-1-
 yl)-2-(pyrrolidín-1-yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-2,6-dithiomorfolino-9*H*-purin, 9-(4-hydroxybenzyl)-
 2,6-dithiomorfolino-9*H*-purin, 2-(azetidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-6-thiomorfolino-9*H*-purin,
 9-(4-hydroxybenzyl)-2-(pyrrolidín-1-yl)-6-thiomorfolino-9*H*-purin, 2,6-di(azepan-1-yl)-9-(4-
 hydroxybenzyl)-9*H*-purin.

Látky podle tohoto vynálezu mají široké spektrum biologických účinků, včetně zvyšování viability
 neuronů, redukce oxidativního stresu, neuroprotektivity a aktivace Nrf-2. Tyto účinky jsou
 zejména výhodné pro léčbu neurodegenerativních chorob a odpovídají spektru účinků, které jsou
 požadovány od látek určených pro takovou léčbu.

C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9*H*-purinové deriváty obecného vzorce I a Ia aktivují signální
 dráhu Nrf2 proteinu, podílející se na antioxidační odpovědi. Tato signální dráha kontroluje expresi
 genů, jejichž proteinové produkty jsou zapojeny v detoxifikaci a eliminaci reaktivních oxidantů a
 elektrofilních činidel cestou konjugativních reakcí a cestou zvýšení buněčné antioxidační kapacity.

C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9*H*-purinové deriváty obecného vzorce I a Ia lze použít při
 ochraně buněk jak *in vivo*, tak *in vitro*, jako antioxidanty pro inhibici nepříznivých metabolických
 procesů v rostlinách a zvířatech.

Předmětem tohoto vynálezu jsou také C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9*H*-purinové deriváty
 obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem tohoto vynálezu jsou C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9*H*-purinové deriváty obecného
 vzorce I a Ia pro použití při léčbě a profylaxi neurodegenerativních onemocnění, kde
 neurodegenerativní onemocnění je s výhodou vybráno ze skupiny zahrnující amyotrofickou

laterální sklerózu, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzy, kortikobazální degenerace, frontotemporální demence, demence s Lewyho tělísky, atrofie mnohočetného systému, chronické traumatické encefalopatie a spinocerebelární ataxie.

5

Předmětem tohoto vynálezu jsou ve výhodném provedení C₂,C₆-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty obecného vzorce I pro použití při léčbě a profylaxi Parkinsonovy nemoci.

10

Tento vynález dále poskytuje farmaceutické kompozice obsahující jeden nebo více C₂,C₆-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů obecného vzorce I společně s alespoň jedním farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

Farmaceutické přípravky

15

Vhodné cesty pro systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutánní), bukální, sublinguální a nasální. Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta a místě onemocnění, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

20

Farmaceutický 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.

25

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

30

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 pomocné látky, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačlá a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrolidon nebo želatinu.

35

40

Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 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 přísadkou antioxidantů, např. vitamínu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-*terc*-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 methanol, ethanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich izomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou, např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholů z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholů z TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, 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

55

olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

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

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

15 Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózoové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogen fosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylenglykol 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, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulózoových preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet, např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

30 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 propylenglykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty, např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

40 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.

45 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, polyethylenglykoly nebo vyšší alkoholy.

50 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 karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory, tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s pomocnými látkami, 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

infuzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

5 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. cetylalkohol, 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. 10 smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylenglykol, sorbitol a/nebo polyethylenglykol, 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. 15

20 Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo sterylalkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropylmyristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou 25 odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové ethery 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 30 obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearylalkoholu nebo stearylalkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylenglykol a polyethylenglykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

35 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.

40 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.

45 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovací pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylenglykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylenglykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže ethanolem, a pokud je to nutné, i ostatní pomocné látky a aditiva. 50

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.

5 Objasnění výkresů

Obrázek 1 ukazuje neuroprotektivní účinek nových C2,C6-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů na Salsolinolem indukovaném modelu Parkinsonovy choroby. Spolu s látkami podle vynálezu byly jako pozitivní kontroly použity Donepezil (DON), Deferoxamin (DFO) a ZM241385 (ZM) v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Všechny výsledky představují průměrnou hodnotu \pm standardní chybu průměru (SEM) v triplicátu (trojnásobné opakování) experimentů (n=9) ve třech různých dnech. ANOVA, Bonferonni post hoc test; *, # P < 0,05; **, ### P < 0,01; ***, #### P < 0,001; * P porovnání se vzorkem se Salsolinol 500 μM , # P porovnání se vzorkem bez Salsolinolu 500 μM . Hodnota P < 0,05 je považována za statisticky významnou.

Obrázek 2 Účinky nových C2,C6-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů na modelu oxidativního stresu (OS) indukovaném Salsolinolem. Látky byly testovány v aktivních koncentracích 1 μM a 10 μM spolu s pozitivními kontrolami DON, DFO a ZM (10 μM), a negativními kontrolami OS-induktory 6-hydroxydopaminem (6-OHDA) a glutamátem (Glu). Všechny výsledky představují průměrnou hodnotu \pm standardní chybu průměru (SEM) v triplicátu (trojnásobné opakování) experimentů (n=9) ve třech různých dnech.

Příklady uskutečnění vynálezu

Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu, aniž by omezovaly jeho rozsah. Pokud není uvedeno jinak, veškerá procenta jsou uváděna jako hmotnostní. Výchozí látky lze získat z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka, atd.) nebo je lze připravit dle návodů uvedených níže.

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na destičkách Silica 60 F₂₅₄ (Merck) s vyvíjecí soustavou petrolether/ethylacetát, kdy byly následně jednotlivé skvrny detekovány pomocí UV světla o vlnové délce 254 nm. Pro čištění látek pomocí sloupcové chromatografie byl použit silikagel Davisil 40-63 micron (Grace Davision). Chromatografická čistota a molekulová hmotnost připravených látek byla změřena pomocí separačního modulu Alliance 2695 (Waters) připojenému k DAD detektoru PDA 996 (Waters) a kvadrupólovému TOF (Time-of-Flight) hmotnostnímu spektrometru Q-ToF micro (Waters). Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a naředěny počáteční mobilní fází na koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Vzorky (10 μl) byly nastříknuty na kolonu s reverzní fází Symmetry C18 (150 mm \times 2,1 mm \times 3,5 μm , Waters) a separovány pomocí následujícího binárního gradientu s průtokem 0,2 ml/min: 0 min, 10% B; 0-24 min, lineární gradient na 90% B, následně 10 min isokratická eluce 90% B. Na konci gradientu byla kolona ekvilibrována na počáteční podmínky. 15 mM kyselina mravenčí titrovaná hydroxidem amonným na pH 4,0 byla použita jako rozpouštědlo (A), a jako organický modifikátor byl použit methanol (rozpouštědlo B). Eluent byl z kolony byl dále veden na DAD detektor (skenovací rozsah 210 až 400 nm s rozlišením 1,2 nm) a ESI zdroj (teplota zdroje 110 $^{\circ}\text{C}$, kapilární napětí +3,0 kV, napětí na vstupním kuželu (cone voltage) +20 V, desolvatační teplota 250 $^{\circ}\text{C}$). Dusík byl použit jako desolvatační (500 l/h) i zmlžovací plyn (50 l/h). Data byla získána v pozitivním (ESI+) ionizačním módu v rozsahu 50 až 1000 m/z. Elementární analýza byla změřena na analyzátoru Flash EA 1112 (Thermo Scientific) a získaná data jsou průměrem třech měření. ^1H a ^{13}C NMR spektra byla pořízena na spektrometru Jeol ECA-500 s frekvencí 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Vzorky pro měření byly rozpuštěny v DMSO-*d*₆ nebo CDCl₃ a chemické posuny byly kalibrovány na pík residuálního rozpouštědla (DMSO-*d*₅ – 2,49 ppm, CHCl₃ -7,26 pro proton) a DMSO-*d*₆ nebo CDCl₃ (DMSO-*d*₆ – 39,5 ppm a CDCl₃ – 77,0 pro uhlík).

C2,C6-disubstitované-9-benzyl-9H-purinové deriváty byly připraveny z 2,6-dichlorpurinu. Prvně byl purin modifikován v pozici N9 reakcí 2,6-dichlorpurinu s odpovídajícím

benzylhalogenidem v bezvodém *N,N*-dimethylformamidu a v přítomnosti uhličitanu draselného, případně reakcí s odpovídajícím benzylalkoholem za použití Mitsunobuovy reakce. V případě C2,C6 symetrických látek byly substituenty na pozici C2 a C6 připojeny v jednom kroku zahřívání 2,6-dichlor-9-benzyl-9*H*-purinu na 165 °C s nadbytkem odpovídajícího cyklického aminu a Hünigovy báze. C2,C6-asymetrické deriváty byly připraveny ve dvou krocích, kdy v prvním kroku byl nukleofilní substitucí zaveden substituent do polohy C6 reakcí 2,6-dichlor-9-benzyl-9*H*-purinu s cyklickým aminem a triethylaminem v refluxujícím propanolu. Následně byla provedena substituce v pozici C2 za stejných podmínek jako v případě C2,C6 symetrických látek.

10 Modifikace purinu v poloze N9:

A) Reakce 2,6-dichlorpurinu s benzylhalogenidy

2,6-Dichlorpurin (2 g, 10,58 mmol) a uhličitan draselný (4,39 g, 31,74 mmol) byl pod argonovou atmosférou rozsuspendován v suchém *N,N*-dimethylformamidu (53 ml) a míchán 30 minut za teploty místnosti. K suspenzi byl přikápan benzylhalogenid (12,70 mmol) a reakční směs byla míchána za teploty místnosti dalších 16 h. Výsledná suspenze byla nalita do ledové vody (300 ml) a extrahována ethylacetátem (6× 30 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (2× 50 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a odpařeny za sníženého tlaku. N9-izomer byl získán přečištěním na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze petrolether/ethylacetát 4:1 s následným gradientem ethylacetátu.

Příklad 1 – 9-benzyl-2,6-dichlor-9*H*-purin

25 Připraven z 2,6-dichlorpurinu a benzylbromidu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₂H₈Cl₂N₄, výtěžek (%): 53. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 26,18; 98,0.

ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 279,4 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺), 281,4 (79, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 51,64/51,19; 2,89/2,54; 20,07/19,43. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,49 (s, 2H); 7,29-7,37 (m, 5H); 8,83 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 47,0; 2× 127,5; 128,0; 2× 128,7; 130,4; 135,5; 148,3; 149,7; 151,0; 153,3.

Příklad 2 – 2,6-dichlor-9-(2,6-dichlorbenzyl)-9*H*-purin

35 Připraven z 2,6-dichlorpurinu a 2,6-dichlorbenzylbromidu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₂H₆Cl₄N₄, výtěžek (%): 55. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 27,75; 98,5%. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 347,4 [³⁵Cl-M+H]⁺, 349,4 (79, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 41,41/ 41,65; 1,74/ 1,59; 16,10/16,49. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5,67 (s, 2H); 7,47 (dd, *J* = 8,9; 7,3 Hz, 1H); 7,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 8,61 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 43,7; 2× 129,1; 129,5; 130,2; 131,7; 2× 136,0; 148,1; 149,8; 151,1; 153,3.

B) Reakce 2,6-dichlorpurinu s benzylalkoholy pomocí Mitsunobuovy reakce

45 DIAD (diisopropylazodikarboxylát, 625 μl, 3,18 mmol) byl pod argonovou atmosférou přikápan do roztoku 2,6-dichlorpurinu (0,5 g, 2,65 mmol), benzylalkoholu (3,18 mmol) a trifenyfosfinu (833 mg, 3,18 mmol) v suchém THF (tetrahydrofuran, 18 ml). Reakční směs byla míchána jednu hodinu za teploty místnosti a poté za sníženého tlaku odpařena. Většina vedlejšího produktu (trifenyfosfinoxidu) byla odstraněna rekrystalizací v horkém toluenu (10 ml). Surový produkt byl posléze přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s použitím mobilní fáze petrolether/ethylacetát 5:1 s následným gradientem ethylacetátu.

Příklad 3 – 2,6-dichlor-9-(2-methoxybenzyl)-9*H*-purin

55 Připraven z 2,6-dichlorpurinu a 2-methoxybenzylalkoholu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₁₃H₁₀Cl₂N₄O, výtěžek (%): 49. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 26,25; 98,9. ESI⁺-

MS m/z (rel. int. %, ion): 309,4 (100, [$^{35}\text{Cl-M+H}^+$]); 311,4 (78, [$^{37}\text{Cl-M+H}^+$]). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 55,51/54,88; 3,26/3,59; 18,12/17,51. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,80 (s, 3H); 5,40 (s, 2H); 6,91 (td, $J = 7,4$; 1,0 Hz, 1H); 7,03 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 7,13 (dd, $J = 7,3$; 1,5 Hz, 1H); 7,32 (td, $J = 7,9$; 1,5 Hz, 1H); 8,70 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43,2; 55,4; 111,0; 120,4; 122,9; 129,3; 129,9; 130,3; 148,8; 149,6; 150,9; 153,4; 156,9.

Příklad 4 – 2,6-dichlor-9-(2-chlorbenzyl)-9H-purin

Připraven z 2,6-dichlorpurinu a 2-chlorbenzylalkoholu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{N}_4$, výtěžek (%): 53. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 27,23; 97,2.

ESI $^+$ -MS m/z (rel. int. %, ion): 313,4 (99, [$^{35}\text{Cl-M+H}^+$]); 315,4 (100, [$^{37}\text{Cl-M+H}^+$]). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 45,96/45,87; 2,25/2,19; 17,87/18,12. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,57 (s, 2H); 7,14 (dd, $J = 7,6$; 1,2 Hz, 1H); 7,30 (td, $J = 7,6$; 1,0 Hz, 1H); 7,37 (td, $J = 7,7$; 1,6 Hz, 1H); 7,52 (dd, $J = 7,9$; 0,9 Hz, 1H); 8,77 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 45,2; 127,7; 2 \times 129,6; 130,0; 130,5; 132,1; 132,6; 148,6; 149,9; 151,1; 153,5.

Příklad 5 – 9-(2-brombenzyl)-2,6-dichlor-9H-purin

Připraven z 2,6-dichlorpurinu a 2-brombenzylalkoholu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{BrCl}_2\text{N}_4$, výtěžek (%): 62. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 23,08; 97,1.

ESI $^+$ -MS m/z (rel. int. %, ion): 357,1 (100, [$^{35}\text{Cl-}^{35}\text{Cl-}^{79}\text{Br-M+H}^+$]); 359,0 (97, [$^{35}\text{Cl-}^{37}\text{Cl-}^{79}\text{Br-M+H}^+$], [$^{35}\text{Cl-}^{35}\text{Cl-}^{81}\text{Br-M+H}^+$]); 361,0 (62, [$^{37}\text{Cl-}^{37}\text{Cl-}^{79}\text{Br-M+H}^+$], [$^{35}\text{Cl-}^{37}\text{Cl-}^{81}\text{Br-M+H}^+$]). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 40,26/40,33; 1,97/2,23; 15,65/15,32. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,53 (s, 2H); 7,05 (dd, $J = 7,5$; 1,7 Hz, 1H); 7,30 (td, $J = 7,6$; 1,8 Hz, 1H); 7,34 (td, $J = 7,5$; 1,4 Hz, 1H); 7,70 (dd, $J = 7,8$; 1,4 Hz, 1H); 8,76 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 47,6; 122,1; 128,2; 129,4; 130,2; 130,5; 132,9; 134,1; 148,6; 149,9; 151,1; 153,6.

Tabulka 1. Příklady připravených 2,6-dichlor-9-benzyl-9H-purinových derivátů

	SUBSTITUENT NA PURINU	CHN ANALÝZA	MS ANALÝZA
Látka	N9	[%C, %H, %N] [kalk./anal.]	[M+H] $^+$
1	2-methylbenzyl	53,26/53,48; 3,44/3,66; 19,11/19,35	293
2	3-methylbenzyl	53,26/53,32; 3,44/3,61; 19,11/19,05	293
3	4-methylbenzyl	53,26/53,30; 3,44/3,26; 19,11/19,00	293
4	2-hydroxybenzyl	48,84/49,05; 2,73/2,91; 18,98/19,17	295
5	3-hydroxybenzyl	48,84/48,64; 2,73/2,69; 18,98/18,62	295
6	4-hydroxybenzyl	48,84/48,77; 2,73/2,45; 18,98/18,59	295
7	3-methoxybenzyl	50,51/50,55; 3,26/3,29; 18,12/18,20	309
8	4-methoxybenzyl	50,51/50,23; 3,26/3,48; 18,12/18,49	309
9	2-fluorbenzyl	48,51/48,61; 2,37/2,43; 18,86/19,12	297
10	3-fluorbenzyl	48,51/48,62; 2,37/2,46; 18,86/19,05	297
11	4-fluorbenzyl	48,51/48,33; 2,37/2,49; 18,86/18,61	297
12	3-chlorbenzyl	45,96/45,83; 2,25/2,12; 17,87/17,98	312
13	4-chlorbenzyl	45,96/46,29; 2,25/2,41; 17,87/18,03	312
14	3-brombenzyl	40,26/40,00; 1,97/2,06; 15,65/15,38	356
15	4-brombenzyl	40,26/40,51; 1,97/1,79; 15,65/15,83	356

Syntéza C2,C6-symetrických látek

9-Benzyl-2,6-dichlor-9*H*-purin (0,485 mmol) byl zahříván 4 h na 165 °C s odpovídajícím
 5 cyklickým aminem (7,28 mmol) a Hünigovou bází (422 µl, 2,43 mmol). Po ochlazení byla reakční
 směs naředěna vodou (10 ml) a extrahována chloroformem (4× 10 ml). Spojené organické frakce
 byly promyty solankou (10 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt
 byl přečištěn na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethylacetát
 5:1 s následným gradientem ethylacetátu.

10

Příklad 6 – 9-benzyl-2,6-di(piperidin-1-yl)-9*H*-purin

Připraven z 9-benzyl-2,6-dichlor-9*H*-purinu a piperidinu. Pevná bílá látka, sumární vzorec:
 C₂₂H₂₈N₆, výtěžek (%): 70. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 35,30; 99,9. ESI⁺-MS
 15 *m/z* (rel. int. %, ion): 377,7 (100, [M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 70,18/69,43; 7,50/7,78;
 22,32/21,94. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,47-1,48 (m, 4H); 1,52-1,53 (m, 6H); 1,62
 (s, 2H); 3,66 (s, 4H); 4,07 (bs, 4H); 5,19 (s, 2H); 7,25-7,26 (m, 1H); 7,29-7,32 (m, 4H); 7,85 (s,
 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,3; 24,5; 2× 25,2; 2× 25,5; 44,8; 2× 45,3; 2×
 45,6; 112,8; 127,5; 2× 127,8; 2× 128,5; 136,6; 137,5; 152,8; 153,2; 158,0.

20

Příklad 7 – 9-(3-hydroxybenzyl)-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9*H*-purin

Připraven z 2,6-dichlor-9-(3-hydroxybenzyl)-9*H*-purinu a pyrrolidinu. Pevná bílá látka, sumární
 vzorec: C₂₀H₂₄N₆O, výtěžek (%): 72. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 29,03; 98,2.
 25 ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 365,7 (100, [M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 65,91/65,67;
 6,64/6,42, 23,06/23,28. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,84-1,87 (m, 8H); 3,45-3,47 (m,
 4H); 3,59 (bs, 2H); 3,95 (bs, 2H); 5,10 (s, 2H); 6,63-6,64 (m, 2H); 6,73 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,09
 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,74 (s, 1H); 9,40 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6; 2×
 25,1; 25,7; 45,3; 3× 46,3; 48,0; 113,1; 114,3; 114,4; 118,1; 129,5; 136,6; 139,1; 152,3; 152,5;
 30 157,3; 157,4.

30

Příklad 8 – 9-(2-methoxybenzyl)-2,6-dimorfolino-9*H*-purin

Připraven z 2,6-dichlor-9-(2-methoxybenzyl)-9*H*-purinu a morfolinu. Bílá pevná látka, sumární
 35 vzorec: C₂₁H₂₆N₆O₃, výtěžek (%): 88. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 27,90; 99,9.
 ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 411,8 (100, [M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 61,45/61,39;
 6,38/6,11; 20,47/20,59. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3,60 (bs, 8H); 3,66 (bs, 4H); 3,82
 (s, 3H); 4,10 (bs, 4H); 5,15 (s, 2H); 6,86 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 6,99-7,02 (m, 2H); 7,26 (t, *J* = 7,3 Hz,
 1H); 7,80 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 41,3; 2× 44,6; 2× 45,0; 55,4; 2× 66,0;
 40 2× 66,2; 110,8; 113,3; 120,2; 124,5; 129,1; 129,3; 137,9; 152,9; 153,2; 156,7; 158,0.

40

Příklad 9 – 9-(2-brombenzyl)-2,6-dithiomorfolino-9*H*-purin

Připraven z 9-(2-brombenzyl)-2,6-dichlor-9*H*-purinu a thiomorfolinu. Nažloutlá pevná látka,
 45 sumární vzorec: C₂₀H₂₃BrN₆S₂, výtěžek (%): 65. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %):
 35,67; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 491,9 (87, [⁷⁹Br-M+H]⁺); 493,9 (100, [⁸¹Br-M+H]⁺).
 EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 48,88/48,85; 4,72/4,77; 17,10/17,15. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-
*d*₆) δ (ppm): 2,49-2,51 (m, 4H); 2,64-2,66 (m, 4H); 3,95-3,97 (m, 4H); 4,39 (bs, 4H); 5,29 (s, 2H);
 7,15 (dd, *J* = 7,6; 1,2 Hz, 1H); 7,24 (td, *J* = 7,6; 1,4 Hz, 1H); 7,33 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H); 7,64 (d, *J* =
 50 7,0 Hz, 1H); 7,92 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2× 25,5; 2× 26,2; 46,3; 3×
 46,6; 47,3; 112,9; 122,6; 127,9; 129,8; 130,3; 132,7; 135,6; 137,7; 153,0; 153,1; 157,2.

50

Příklad 10 – 9-(2,6-dichlorbenzyl)-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin

- 5 Přípraven z 9-(2,6-dichlorbenzyl)-2,6-dichlor-9H-purinu a pyrrolidinu. Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₂Cl₂N₆, výtěžek (%): 46. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 35,37; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 417,8 (99, [³⁵Cl-M+H]⁺); 419,8 (100, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 57,56/57,58; 5,31/5,33; 20,14/20,10. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,81-1,87 (m, 8H); 3,36-3,38 (m, 4H); 3,55 (bs, 2H); 3,91 (bs, 2H); 5,38 (s, 2H); 7,38 (dd, *J* = 8,6; 7,6 Hz, 1H); 7,49 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,54 (s, 1H).
- 10 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6; 2× 25,0; 25,7; 42,4; 3× 46,2; 48,0; 112,9; 2× 128,7; 130,8; 131,1; 136,0; 2× 136,5; 152,3; 152,4; 157,0.

Tabulka 2. Příklady připravených C2,C6-symetrických 9-benzyl-9H-purinových derivátů

SUBSTITUENT NA PURINU			CHN ANALÝZA	MS ANALÝZA
Látka	C2+C6	N9	[%C, %H, %N] [kalk./anal.]	[M+H] ⁺
1	azetidin-1-yl	benzyl	67,48/67,23; 6,29/6,42; 26,23/26,30	321
2	pyrrolidin-1-yl	benzyl	68,94/68,87; 6,94/6,63; 24,12/24,48	349
3	azepan-1-yl	benzyl	71,25/71,15; 7,97/8,02; 20,77/20,79	405
4	morfolino	benzyl	63,14/63,32; 6,36/6,15; 22,09/22,19	381
5	thiomorfolino	benzyl	58,22/57,84; 5,86/5,59; 20,37/20,25	413
6	piperazin-1-yl	benzyl	63,47/63,58; 6,92/6,86; 29,61/29,50	379
7	4-methylpiperazin-1-yl	benzyl	65,00/64,63; 7,44/7,29; 27,56/28,01	407
8	piperazin-1-yl	2-methylbenzyl	64,26/63,98; 7,19/7,36; 28,55/28,73	393
9	pyrrolidin-1-yl	2-methylbenzyl	69,58/69,35; 7,23/7,11; 23,19/23,51	363
10	azetidin-1-yl	2-methylbenzyl	68,24/68,49; 6,63/6,82; 25,13/24,69	335
11	thiomorfolino	2-methylbenzyl	59,12/58,87; 6,14/6,45; 19,70/19,32	427
12	piperidin-1-yl	2-methylbenzyl	70,74/71,02; 7,74/7,76; 21,52/21,16	391
13	morfolino	3-methylbenzyl	63,94/63,66; 6,64/6,61; 21,30/21,69	395
14	piperazin-1-yl	3-methylbenzyl	64,26/64,25; 7,19/7,25; 28,55/28,48	393
15	pyrrolidin-1-yl	3-methylbenzyl	69,58/69,64; 7,23/7,28; 23,19/23,28	363
16	azepan-1-yl	3-methylbenzyl	71,74/71,75; 8,19/8,26; 20,08/19,96	419
17	piperidin-1-yl	4-methylbenzyl	70,74/70,60; 7,74/7,81; 21,52/21,61	391

18	azetidin-1-yl	4-methylbenzyl	68,24/68,15; 6,63/6,54; 25,13/25,31	335
19	morfolino	4-methylbenzyl	63,94/63,98; 6,64/6,87; 21,30/21,06	395
20	pyrrolidin-1-yl	4-methylbenzyl	69,58/69,89; 7,23/7,17; 23,19/22,97	363
21	morfolino	2-hydroxybenzyl	60,59/60,46; 6,10/6,18; 21,20/21,49	397
22	piperidin-1-yl	2-hydroxybenzyl	67,32/67,46; 7,19/7,01; 21,41/21,69	393
23	pyrrolidin-1-yl	2-hydroxybenzyl	65,91/65,73; 6,64/6,89; 23,06/22,77	365
24	piperazin-1-yl	2-hydroxybenzyl	60,89/60,77; 6,64/6,36; 28,41/28,22	395
25	azetidin-1-yl	3-hydroxybenzyl	64,27/64,43; 5,99/6,06; 24,98/24,86	337
26	pyrrolidin-1-yl	3-hydroxybenzyl	65,91/65,83; 6,64/6,48; 23,06/23,28	365
27	4-methylpiperazin-1-yl	3-hydroxybenzyl	62,54/62,81; 7,16/7,26; 26,52/26,48	423
28	thiomorfolino	3-hydroxybenzyl	56,05/56,00; 5,64/5,61; 19,61/19,83	429
29	piperidin-1-yl	3-hydroxybenzyl	67,32/67,17; 7,19/7,35; 21,41/21,68	393
30	pyrrolidin-1-yl	4-hydroxybenzyl	65,91/66,18; 6,64/6,68; 23,06/23,15	365
31	morfolino	4-hydroxybenzyl	60,59/60,41; 6,10/6,15; 21,20/21,28	397
32	azetidin-1-yl	4-hydroxybenzyl	64,27/64,33; 5,99/6,13; 24,98/24,68	337
33	azepan-1-yl	4-hydroxybenzyl	68,54/68,93; 7,67/7,49; 19,98/20,21	421
34	piperazin-1-yl	4-hydroxybenzyl	60,89/61,15; 6,64/6,55; 28,41/28,11	395
35	pyrrolidin-1-yl	2-methoxybenzyl	66,64/66,82; 6,92/6,84; 22,21/22,08	379
36	azetidin-1-yl	2-methoxybenzyl	65,12/65,34; 6,33/6,47; 23,98/22,76	351
37	4-methylpiperazin-1-yl	2-methoxybenzyl	63,28/63,35; 7,39/7,65; 25,67/25,20	437
38	thiomorfolino	3-methoxybenzyl	56,99/56,77; 5,92/6,14; 18,99/19,26	443
39	piperidin-1-yl	3-methoxybenzyl	67,95/67,61; 7,44/7,35; 20,67/20,83	407
40	azepan-1-yl	3-methoxybenzyl	69,09/69,42; 7,89/7,63; 19,34/19,65	435
41	piperazin-1-yl	3-methoxybenzyl	61,74/61,63; 6,91/7,15; 27,43/27,37	409
42	pyrrolidin-1-yl	3-methoxybenzyl	66,64/66,32; 6,92/7,23; 22,21/22,56	379
43	morfolino	4-methoxybenzyl	61,45/61,24; 6,38/6,63; 20,47/20,29	411

44	piperidin-1-yl	4-methoxybenzyl	67,95/68,13; 7,44/7,16; 20,67/20,81	407
45	azetidin-1-yl	4-methoxybenzyl	65,12/65,03; 6,33/6,28; 23,98/23,81	351
46	pyrrolidin-1-yl	4-methoxybenzyl	66,64/66,56; 6,92/7,01; 22,21/22,13	379
47	piperazin-1-yl	2-fluorbenzyl	60,59/60,38; 6,36/6,49; 28,26/28,56	396
48	azetidin-1-yl	2-fluorbenzyl	63,89/63,61; 5,66/5,72; 24,84/24,91	338
49	morfolino	2-fluorbenzyl	60,29/60,35; 5,82/5,68; 21,09/21,22	398
50	pyrrolidin-1-yl	3-fluorbenzyl	65,55/65,60; 6,33/6,40; 22,93/23,01	366
51	azepan-1-yl	3-fluorbenzyl	68,22/68,00; 7,93/8,15; 19,89/20,13	422
52	piperazin-1-yl	4-fluorbenzyl	60,59/60,68; 6,36/6,21; 28,26/28,39	396
53	thiomorfolino	4-fluorbenzyl	55,79/55,77; 5,38/5,36; 19,52/19,55	430
54	piperidin-1-yl	4-fluorbenzyl	66,98/66,71; 6,90/6,82; 21,30/21,44	394
55	4-methylpiperazin-1-yl	4-fluorbenzyl	62,24/62,38; 6,89/7,21; 26,40/26,22	424
56	piperidin-1-yl	2-chlorbenzyl	64,30/64,61; 6,62/6,35; 20,45/20,34	411
57	morfolino	2-chlorbenzyl	57,90/57,96; 5,59/5,70; 20,26/20,44	415
58	piperazin-1-yl	2-chlorbenzyl	58,17/58,15; 6,10/6,10; 27,14/27,18	413
59	4-methylpiperazin-1-yl	2-chlorbenzyl	59,92/60,05; 6,63/6,78; 25,41/25,39	441
60	azetidin-1-yl	3-chlorbenzyl	60,93/60,85; 5,40/5,27; 23,68/23,84	354
61	pyrrolidin-1-yl	3-chlorbenzyl	62,74/62,57; 6,05/5,87; 21,95/22,09	382
62	azepan-1-yl	4-chlorbenzyl	65,66/65,48; 7,12/6,98; 19,14/19,05	438
63	thiomorfolino	4-chlorbenzyl	53,74/53,86; 5,19/5,01; 18,80/18,99	447
64	piperazin-1-yl	4-chlorbenzyl	58,17/58,15; 6,10/6,10; 27,14/27,18	413
65	azepan-1-yl	2-brombenzyl	59,63/59,75; 6,46/6,51; 17,38/17,46	483
66	piperidin-1-yl	2-brombenzyl	58,02/57,98; 5,98/6,21; 18,45/18,65	455
67	4-methylpiperazin-1-yl	2-brombenzyl	54,43/54,52; 6,02/6,14; 23,08/22,76	485
68	pyrrolidin-1-yl	3-brombenzyl	56,21/56,22; 5,42/5,40; 19,67/19,78	427

69	thiomorfolino	3-brombenzyl	48,88/45,01; 4,72/4,51; 17,10/16,83	491
70	azepan-1-yl	4-brombenzyl	59,63/59,77; 6,46/6,53; 17,38/17,41	483
71	morfolino	4-brombenzyl	52,30/52,49; 5,05/4,81; 18,30/18,56	459
72	piperidin-1-yl	4-brombenzyl	58,02/58,20; 5,98/6,13; 18,45/18,21	455
73	azetidín-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	55,54/55,68; 4,66/4,71; 21,59/21,36	389
74	pyrrolidin-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	57,56/57,48; 5,31/5,33; 20,14/19,87	418
75	piperazin-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	53,70/53,61; 5,41/5,38; 25,05/25,17	447
76	morfolino	2,6-dichlorbenzyl	53,46/53,56; 4,94/5,06; 18,70/18,92	449

Syntéza C2,C6-asymetrických látek:

A) Nukleofilní substituce na purinu v pozici C6

5

Suspenze 9-benzyl-2,6-dichlor-9*H*-purinu (0,717 mmol), cyklického aminu (0.860 mmol) a triethylaminu (250 μ l, 1,793 mmol) byla 4 h refluxována v *n*-propanolu (7,17 ml). Následně byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl rozředěn vodou (15 ml) a extrahován ethylacetátem (5 \times 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (15 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethylacetát 8:1 s gradientem ethylacetátu.

10

Příklad 11– 9-benzyl-2-chlor-6-(piperidin-1-yl)-9*H*-purin

15

Bezbarvý olej, sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClN₅, výtěžek (%): 98. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 29,65; 99,4. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 328,6 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 330,6 (52, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 62,29/61,92; 5,53/5,73; 21,36/20,97. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,55 (s, 4H); 1,61-1,64 (m, 2H); 3,83 (s, 2H); 4,43 (bs, 2H); 5,33 (s, 2H); 7,25-7,34 (m, 5H); 8,26 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,0; 2 \times 25,6; 44,5; 46,2; 46,8; 117,8; 2 \times 127,3; 127,8; 2 \times 128,7; 136,6; 140,1; 151,5; 152,8; 153,2.

20

B) Nukleofilní substituce na purinu v pozici C2

25

9-Benzyl-2-chlor-6-substituovaný-9*H*-purin (0,342 mmol) byl zahříván na 165 °C s cyklickým aminem (5,13 mmol) a Hünigovou bází (296 μ l, 1,71 mmol) po dobu 4 h. Po ochlazení byla směs naředěna vodou (10 ml) a extrahována chloroformem (5 \times 10 ml). Spojené organické frakce byly promyty solankou (10 ml), vysušeny (Na₂SO₄) a opařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází petrolether/ethylacetát 10:1 s gradientem ethylacetátu.

30

Příklad 12 – 9-benzyl-2-(piperidin-1-yl)-6-(pyrrolidin-1-yl)-9*H*-purin

35

Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₁H₂₆N₆, výtěžek (%): 68. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 33,38; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 363,7 (100, [M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 69,58/69,42; 7,23/7,15; 23,19/23,41. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,44-1,49 (m, 4H); 1,54-1,57 (m, 2H); 1,89 (bs, 4H); 3,54 (bs, 2H); 3,67-3,69 (m, 4H); 3,95 (bs, 2H); 5,19 (s, 2H); 7,27-7,23 (m, 1H); 7,31 (d, *J* = 4,3 Hz, 4H); 7,81 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23,6; 24,5; 2 \times 25,2; 25,9; 2 \times 44,8; 45,5; 46,5; 48,0; 113,2; 127,5; 2 \times 127,7; 2 \times 128,5; 137,1; 137,6; 152,2; 152,5; 158,3.

Příklad 13 – 9-benzyl-6-(piperidin-1-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin

5 Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₁H₂₆N₆, výtěžek (%): 74. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 33,53; 99,9. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 363,7 (100, [M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 69,58/69,49; 7,23/7,51; 23,19/23,02. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 1,49-1,54 (m, 4H); 1,60-1,62 (m, 2H); 1,85-1,87 (m, 4H); 3,44 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H); 4,09 (bs, 3H); 5,18 (s, 2H); 7,23-7,27 (m, 1H); 7,30-7,33 (m, 2H); 7,34-7,35 (m, 2H); 7,82 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24,4; 2× 25,0; 2× 25,6; 2× 45,3; 45,6; 2× 46,3; 112,7; 127,5; 2× 127,8; 10 2× 128,5; 136,0; 137,5; 152,9; 153,1; 156,9.

Příklad 14 – 9-(2,6-dichlorbenzyl)-2-morfolino-6-(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin

15 Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₂Cl₂N₆O, výtěžek (%): 62. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 31,17; 98,1. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 433,7 (98, [³⁵Cl-M+H]⁺); 435,7 (100, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 55,43/55,59; 5,12/5,26; 19,39/19,66. ¹H-NMR (500 MHz, δ (ppm): 1,96 (bs, 4H); 3,68 (bs, 2H); 3,76-3,80 (m, 8H); 4,07 (bs, 2H); 5,48 (s, 2H); 7,24 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,35-7,37 (m, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24,0; 26,3; 42,4; 2× 45,1; 47,1; 48,3; 2× 67,0; 113,7; 2× 128,6; 130,3; 131,2; 135,9; 2× 136,7; 152,2; 152,7; 158,8.

Příklad 15 – 9-(2,6-dichlorbenzyl)-6-morfolino-2-thiomorfolino-9H-purin

25 Bílá pevná látka, sumární vzorec: C₂₀H₂₂Cl₂N₆OS, výtěžek (%): 58. HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min.; %): 32,77; 99,8. ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 465,8 (100, [³⁵Cl-M+H]⁺); 467,8 (85, [³⁷Cl-M+H]⁺). EA (%C, %H, %N, kalk./anal.): 51,61/51,75; 4,76/4,82; 18,06/18,21. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,59-2,61 (m, 4H); 3,79-3,81 (m, 4H); 4,11-4,13 (m, 4H); 4,17 (bs, 4H); 5,48 (s, 2H); 7,25 (dd, *J* = 8,6; 7,3 Hz, 1H); 7,36 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 7,40 (s, 1H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2× 26,5; 42,6; 2× 45,2; 2× 47,1; 2× 66,9; 113,4; 2× 128,6; 130,3; 131,0; 136,0; 2× 136,7; 153,2; 153,8; 157,5.

Tabulka 2. Příklady připravených C2,C6-asymetrických 9-benzyl-9H-purinových derivátů

SUBSTITUENT NA PURINU				CHN ANALÝZA	MS ANALÝZA
Látk a	C2	C6	N9	[%C, %H, %N] [kalk./anal.]	[M+H] ⁺
77	piperidin-1-yl	pyrrolidin-1-yl	benzyl	69,58/69,52; 7,23/7,27; 23,19/23,22	363
78	pyrrolidin-1-yl	piperidin-1-yl	benzyl	69,58/69,63; 7,23/7,21; 23,19/23,16	363
79	morfolino	piperidin-1-yl	benzyl	66,64/66,84; 6,92/6,81; 22,21/22,40	379
80	piperidin-1-yl	morfolino	benzyl	66,64/66,81; 6,92/7,25; 22,21/22,09	379
81	pyrrolidin-1-yl	morfolino	benzyl	65,91/65,87; 6,64/6,98; 23,06/22,86	365
82	piperazin-1-yl	azetidin-1-yl	2-methylbenzyl	66,09/65,84; 6,93/7,13; 26,98/27,04	363
83	morfolino	pyrrolidin-1-yl	2-methylbenzyl	66,64/66,48; 6,92/7,09; 22,21/22,51	378
84	piperidin-1-yl	4-methylpiperazi n-1-yl	3-methylbenzyl	68,12/68,03; 7,70/7,81; 24,18/24,16	405

85	azepan-1-yl	pyrrolidin-1-yl	3-methylbenzyl	70,74/70,68; 7,74/7,92; 21,52/21,41	390
86	piperazin-1-yl	thiomorfolino	4-methylbenzyl	61,59/61,74; 6,64/6,49; 23,94/24,06	409
87	azetidin-1-yl	piperidin-1-yl	4-methylbenzyl	69,58/69,35; 7,23/7,44; 23,19/23,21	362
88	morfolino	4-methylpiperazi n-1-yl	2-hydroxybenzyl	61,60/61,72; 6,65/6,36; 23,94/24,12	409
89	azetidin-1-yl	pyrrolidin-1-yl	2-hydroxybenzyl	65,12/65,00; 6,33/6,17; 23,98/24,28	350
90	4-methylpiperazin-1-yl	piperidin-1-yl	3-hydroxybenzyl	64,84/64,59; 7,17/7,36; 24,06/23,81	407
91	azepan-1-yl	azetidin-1-yl	3-hydroxybenzyl	66,64/66,27; 6,92/7,09; 22,21/22,48	378
92	piperazin-1-yl	morfolino	3-hydroxybenzyl	60,74/60,61; 6,37/6,45; 24,79/24,54	395
93	pyrrolidin-1-yl	azepan-1-yl	4-hydroxybenzyl	67,32/67,41; 7,19/7,26; 21,41/21,38	392
94	thiomorfolino	piperazin-1-yl	4-hydroxybenzyl	58,37/58,42; 6,12/5,97; 23,83/24,00	411
95	piperidin-1-yl	4-methylpiperazi n-1-yl	2-methoxybenzyl	65,53/65,27; 7,41/7,35; 23,26/23,59	421
96	azetidin-1-yl	thiomorfolino	2-methoxybenzyl	60,58/50,73; 6,10/6,04; 21,20/21,39	396
97	morfolino	pyrrolidin-1-yl	2-methoxybenzyl	63,94/64,06; 6,64/6,78; 21,30/21,42	394
98	4-methylpiperazin-1-yl	azepan-1-yl	3-methoxybenzyl	66,18/65,81; 7,64/7,49; 22,51/22,36	435
99	pyrrolidin-1-yl	piperidin-1-yl	3-methoxybenzyl	67,32/67,41; 7,19/7,02; 21,41/21,56	392
100	piperazin-1-yl	4-methylpiperazin-1-yl	4-methoxybenzyl	62,54/62,67; 7,16/7,28; 26,52/26,34	422
101	thiomorfolino	azetidin-1-yl	4-methoxybenzyl	60,58/60,64; 6,10/6,22; 21,20/21,09	396
102	azepan-1-yl	pyrrolidin-1-yl	2-chlorbenzyl	64,30/64,32; 6,62/6,70; 20,45/20,34	410
103	4-methylpiperazin-1-yl	thiomorfolino	2-chlorbenzyl	56,81/57,21; 5,90/5,63; 22,08/22,17	443
104	azetidin-1-yl	piperazin-1-yl	3-chlorbenzyl	59,45/59,32; 5,78/5,91; 25,54/25,49	383
105	pyrrolidin-1-yl	piperidin-1-yl	4-chlorbenzyl	63,55/63,36; 6,35/6,52; 21,17/21,19	396
106	morfolino	azepan-1-yl	4-chlorbenzyl	61,89/62,16; 6,37/6,03; 19,68/19,91	426

107	thiomorfolino	4-methylpiperazin-1-yl	4-chlorbenzyl	56,81/56,92; 5,90/6,00; 22,08/22,28	443
108	piperidin-1-yl	morfolino	2-brombenzyl	55,15/5,18; 5,51/5,49; 18,37/18,42	457
109	piperazin-1-yl	azepan-1-yl	3-brombenzyl	56,17/56,28; 6,00/5,84; 20,84/20,96	470
110	4-methylpiperazin-1-yl	pyrrolidin-1-yl	3-brombenzyl	55,27/55,36; 5,74/5,37; 21,48/21,55	456
111	morfolino	azetidin-1-yl	3-brombenzyl	53,16/53,00; 4,93/5,13; 19,58/19,61	429
112	piperidin-1-yl	4-methylpiperazin-1-yl	4-brombenzyl	56,17/56,29; 6,00/6,35; 20,84/20,71	470
113	azepan-1-yl	piperidin-1-yl	4-brombenzyl	58,85/59,07; 6,23/6,03; 17,90/17,69	469
114	piperazin-1-yl	azetidin-1-yl	2-fluorbenzyl	53,28/53,29; 5,18/5,23; 22,89/22,91	428
115	azetidin-1-yl	morfolino	3-fluorbenzyl	61,94/62,06; 5,75/5,68; 22,81/22,73	368
116	4-methylpiperazin-1-yl	azepan-1-yl	4-fluorbenzyl	65,22/65,06; 7,14/7,11; 23,15/23,31	423
117	piperidin-1-yl	pyrrolidin-1-yl	4-fluorbenzyl	66,29/66,45; 6,62/6,45; 22,09/22,18	380
118	pyrrolidin-1-yl	4-methylpiperazin-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	56,50/56,62; 5,65/5,41; 21,97/22,19	446
119	thiomorfolino	piperazin-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	51,72/51,39; 4,99/5,11; 21,11/22,38	464
120	azetidin-1-yl	pyrrolidin-1-yl	2,6-dichlorbenzyl	56,58/56,52; 5,00/5,07; 20,84/20,79	403

Příklad 16 – -Testy viability na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y (diferenciovaný fenotyp)

Lidská neuroblastomová linie SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266), získána jako dar od Waltera d'Acunto (původně zakoupena z ATCC – American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), byla kultivována v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca a Hamově F12 Nutrient mixu (Dulbecco's modified Eagle's Medium a Ham's F12 Nutrient Mixture (DMEM:F-12, 1:1) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a 1% penicilin/streptomycin mixem v inkubátoru při 37 °C v 5% CO₂, 95% vzduchu a humifikované atmosféře. Limit pasážování byl do ATCC+15. Test byl zahájen buněčnou násadou na 96-jamkové desky (7000 buňkami SH-SY5Y na jamku). Další den, SH-SY5Y buňky podstoupily diferenciační proceduru pomocí all-trans retinové kyseliny (ATRA) po dobu 48 h (ATRA 10 μM). Po 48 hodinách bylo staré DMEM/F12 médium vyměněno čerstvým médiem obsahujícím testované látky v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM po dobu 24 h. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a přidány do média. Maximální koncentrace DMSO v médiu byla udržována pod 0,1 % (v/v). Viabilita byla měřena pomocí Calcein AM (1 mg/ml, ThermoFisher) viabilitního testu. Roztok Calcein AM v PBS (0,5 μM) byl napipetován k buňkám a inkubován po dobu 50 min. Poté byla měřena fluorescence při 488/517 nm (excitace/emise) pomocí mikrostřednickového readeru Infinite M200 (TECAN). Calcein AM viabilitní test je založen na štěpení nefluoreskujícího barviva (Calcein-AM) pomocí intracelulárních esteras živých buněk na fluoreskující barvivo (Calcein), zatímco umírající buňky tuto schopnost ztrácí. Hodnoty v tabulce 4 vyjadřují % viability všech testovaných látek vztažené ke kontrole. Kontrola (médium s DMSO,

< 0,1 % (v/v)) byla stanovena jako 100 % viability (viz první řádek tabulky). Jak je uvedeno v tabulce 4, všechny deriváty prokázaly silný stimulační efekt na neuronálních SH-SY5Y buňkách.

5 Tabulka 4. Vliv nových derivátů na viabilitu lidské neuroblastomové linie SH-SY5Y (diferenciovaný fenotyp)

DMSO	průměr	100,00		±SEM	0,84	
Látka	0,1 μM	±SEM	1 μM	±SEM	10 μM	±SEM
1	104,80	2,09	114,03	4,68	145,94	3,04
4	106,29	2,13	112,63	3,49	146,44	7,06
5	105,87	1,76	125,72	2,53	128,71	5,16
26	108,14	6,34	119,64	5,70	142,50	4,46
30	99,49	3,12	110,63	3,24	122,84	2,87
35	104,22	1,86	118,77	2,36	135,02	5,53
42	112,01	3,06	127,94	3,61	138,52	2,95
74	111,48	3,05	138,17	2,85	151,69	2,93
77	107,19	4,63	118,15	3,90	116,98	3,96
78	105,72	2,48	120,35	5,02	134,18	2,62

Příklad 17 – Viabilitní test na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y (diferenciovaný fenotyp) – Salsolinolem indukovaný model Parkinsonovy choroby (PD)

10

Podobně jako v předchozím testu byly použity 96-jamkové desky se 7000 buňkami SH-SY5Y na jamku. Den po nasadě buněk SH-SY5Y podstoupily buňky diferenciální proceduru pomocí all-trans retinové kyseliny (ATRA) po dobu 48 h. (ATRA 10 μM). Po 48 hodinách bylo staré DMEM/F12 vyměněno čerstvým médiem obsahujícím samotný 500 μM dopaminergní neurotoxin Salsolinol (SAL) nebo testované látky v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM na dobu 24 h. Deferoxamin (DFO), Donepezil (DON) a ZM241385 (ZM) byly použity jako pozitivní kontroly a pro stratifikaci aktivit testovaných látek. Po 24 h. byla měřena buněčná viabilita pomocí Calcein AM viabilitního testu viz výše. Salsolinol indukoval výrazné snížení viability činící 30,7 %. Všechny testované látky prokázaly silný protektivní účinek, a dokonce vyšší účinek než standardní léčiva jako jsou DFO, ZM a DON. Látky 30 a 1 prokázaly nejvyšší protektivní účinek (26,41 % a 26,08 %), vyšší než pozitivní kontroly v koncentraci 10 μM. Látka 74 překvapivě projevila silnou neuroprotekcí od koncentrace 1 μM po 10 μM (20,24 % a 22,35 %). Celkově všechny látky prokázaly značnou účinnost a vyšší neuroprotektivní efekt při 10 μM než pozitivní kontroly DFO, ZM a DON viz obrázek 1 a tabulka 5.

25

Tabulka 5. Neuroprotektivní účinky nových C2,C6-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y (diferenciovaný fenotyp)

Látka	Neuroprotektivní účinek (% kontroly)			p-hodnota
	0,1 μM	1 μM	10 μM	
ZM241385 (ZM)	1,95	7,03	9,31	>0,001
Deferoxamin (DFO)	1,43	4,86	10,52	>0,001
Donepezil (DON)	2,76	6,73	14,25	>0,001
1	N/A	3,03	26,08	>0,001
4	1,70	8,11	21,12	>0,001
5	7,03	18,72	19,89	>0,001
26	4,90	14,43	20,71	>0,001
30	10,62	16,04	26,41	>0,001
35	1,19	13,01	19,11	>0,001

42	6,86	15,44	20,05	>0,001
74	8,57	20,24	22,35	>0,001
77	4,64	12,11	13,8	>0,001
78	N/A	17,95	N/A	>0,001

N/A – netestováno

Příklad 18 – -Měření oxidativního stresu na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y – Salsolinolem indukovaný model PD

5

Testování bylo provedeno v 96-jamkové desce s 7000 buňkami na jamku. Další den po năsadě buněk SH-SY5Y podstoupily buňky diferenciační proceduru po 48 h stejně jako v předchozích příkladech. Testovací procedura zůstala stejná jako v předchozím případě (*Viabilitní test – Salsolinolem indukovaný model PD*). Dále byly použity induktory oxidativního stresu (OS), 6-hydroxydopamin (6-OHDA) a glutamát (Glu), jako negativní kontroly. Negativní kontroly určily práh excesivního OS. Po 6 h inkubaci buněk s médiem obsahujícím: toxin samotný (SAL 500 μ M), kombinaci toxinu a testovaných látek (SAL 500 μ M a testované látky v aktivních koncentracích: 1 a 10 μ M), DMSO kontrolu nebo negativní kontroly, bylo médium vyměněno za PBS roztok s 10 μ M dihydroethidiem (DHE), a poté třepáno po dobu 30 min. Po 30 minutách bylo DHE měřeno při 500 nm/580 nm (excitace/emise). DHE je permeabilní barvivo, které je selektivní pro detekci superoxidového radikálu. Kontrola (médium s DMSO, 0,1 % (v/v)) byla stanovena jako 100 % OS, zatímco u Salsolinolu (toxin) se OS zvýšil třikrát, na 335 %. Látky prokázaly OS-snižující aktivity. Ze všech derivátů prokázaly nejvyšší účinnost látky 30, 77 a 5 ve snížení oxidativního stresu (OS) indukovaného Salsolinolem. Celkově nejlepší látky 30 a 5 prokázaly mírně lepší nebo stejnou OS redukční aktivitu jako nejlepší pozitivní kontrola Donepezil, ale jejich celkový neuroprotektivní účinek překonal Donepezil i při koncentraci 1 μ M. Posun terapeutického okna (neuroprotektivní aktivita a redukce ROS) na nižší koncentrace, např. látek 30 a 5 proti Donepezilu jsou výhodné pro navrhování nového potenciálního léčiva.

25

Tabulka 6. Oxidativní stres indukovaný endogenním neurotoxinem Salsolinolem a ROS redukční aktivita nových C2,C6-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů při testování na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y.

Látka	Oxidativní stres (% kontroly)			
	průměr		SEM ±	
DMSO kontrola	99,60		2,08	
Salsolinol 500 µM	335,36		21,61	
6-OHDA 30 µM ^Δ	215,43		21,97	
Glu 160 mM ^Δ	268,62		19,07	
Positivní kontrola	10 µM		SEM ±	
ZM241385 (ZM)	102,30		12,47	
Deferoxamin (DFO)	100,95		6,83	
Donepezil (DON)	120,10		11,71	
Látky	1 µM	SEM ±	10 µM	SEM ±
1*	124,48	9,55	157,22	5,21
4*	105,57	7,17	155,38	22,62
5*	121,19	6,18	135,37	10,80
26*	107,47	8,56	142,22	17,81
30*	95,86	7,53	97,44	5,50
35*	161,97	24,87	214,57	42,74
42*	171,55	29,23	173,94	23,60
74*	125,98	10,74	178,95	20,35
77*	118,21	10,14	126,84	8,33
78*	135,70	9,58	238,45	20,11

*Průměr (n=9), Δ – -negativní kontrola

Příklad 19 – Schopnost vychytávat radikály stanovená pomocí ORAC

5

Schopnost látek vychytávat volné radikály *in vitro* byla stanovena pomocí metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Fluorescein (100 µl, 500 mM) a 25 µl testované látky byly přidány do každé jamky na 96-jamkové mikrotitrační desce předehřáté na 37 °C. Následně bylo rychle přidáno 25 µl 250mM 2,2'-azobis(2-amidino-propan)dihydrochloridu (AAPH), deska byla protřepána 5 s a poté byla měřena fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 510 nm) každé 3 minuty po dobu 90 minut pomocí fluorescenční čtečky Infinite 200 (TECAN, Switzerland). Veličina NAUC (Net Area Under Curve) byla použita pro výpočet antioxidační aktivity vztažené na jednotku troloxu (hydrofilní ekvivalent vitamínu E, postulován jako standard). Látky s ORAC hodnotou vyšší než 0 aktivně vychytávají volné radikály.

15

Látka	ORAC (látka/trolox)
1	0,052 ± 0,002
4	0,007 ± 0,002
5	0,016 ± 0,001
26	0,126 ± 0,018
30	0,422 ± 0,034
35	0,033 ± 0,001
42	0,029 ± 0,002
74	0,029 ± 0,004
77	0,028 ± 0,001
78	0,071 ± 0,005

*Průměr ± SD (n=3)

Příklad 20 – Aktivace transkripčního faktoru Nrf2

Schopnost látek aktivovat Nrf2-dependentní expresi byla stanovena pomocí reportérové buněčné linie EpRE-LUX. Testované látky byly inkubovány s buňkami po dobu 24 h v koncentracích 100, 10, 1 a 0,1 μM . Po lyzaci buněk (10 mM Tris, 2 mM DTT) byl přidán pufr obsahující 0,2mM luciferin, což je substrát zahajující luminiscenční reakci. Nárůst luminiscence byl měřen přístrojem Infinite M200 (TECAN). Látky s Nrf2 hodnotou vyšší než 0 jsou aktivátory Nrf2 a budou tedy vhodnými látkami pro léčbu neurodegenerativních onemocnění provázaných s oxidativním stresem.

Látka	Nrf2 (relativní luminiscence)
1	0,27 \pm 0,06
4	0,19 \pm 0,02
5	0,17 \pm 0,06
26	0,33 \pm 0,06
30	0,29 \pm 0,11
35	0,04 \pm 0,00
42	0,07 \pm 0,00
74	0,38 \pm 0,08
77	0,16 \pm 0,04
78	0,23 \pm 0,03

*Průměr \pm SD (n=3)

Příklad 21 – Farmaceutické přípravky

Farmaceutické přípravky obvykle obsahují 0,1 až 99 % z hmotnosti, obzvláště 0,1 až 95 % hmotnosti, účinných látek obsahujících C2,C6-disubstituovaný-9-benzyl-9H-purin podle tohoto vynálezu, 1 až 99,9 % hmotnosti alespoň jednoho pevného nebo kapalného excipientu, a od 0 do 25 % hmotnosti, obzvláště 0,1 až 25 % hmotnosti, povrchově aktivního činidla. Tyto prostředky mohou také obsahovat další přísady, jako jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje, činidla proti pěnění, například silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojidla, látky způsobující lepivost anebo jiné aktivní složky. Výhodné formulace mají zejména následující složení: (% = hmotnostní procenta):

25	F1. Smáčivé prášky	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
	ligninsulfonan sodný	4 %	-	3 %	-
	laurylsulfát sodný	2 %	3 %	-	4 %
30	diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	5 %	6 %
	oktylfenolpolyglykol ether (7 až 8 mol ethylenoxid)	-	1 %	2 %	-
	vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
	kaolin	87 %	61 %	37 %	-

35 Aktivní složka je důkladně promísena s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.

40	F2. Suspenzní koncentrát	a)	b)	c)	d)
	Aktivní složka	3 %	10 %	25 %	50 %

	ethylenglykol	5 %	5 %	5 %	5 %
	nonylfenolpolyglykoether (15 mol ethylenoxid)	-	1 %	2 %	-
	lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
5	karboxymethylcelulóza	1 %	1 %	1 %	1 %
	37 % vodný roztok formaldehydu	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
	emulze silikonového oleje	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %
	voda	86 %	78 %	64 %	38 %

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

F3: Suché kapsle

- 15 5000 tobolek, z nichž každá obsahuje 0,25 g C2,C6-disubstituovaného-9-benzyl-9H-purinu, se připraví následujícím způsobem:

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

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

F4: Měkké tobolky

- 25 5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g C2,C6-disubstituovaný-9-benzyl-9H-purin jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

Složení: 250 g Účinná látka + 21 g Lauroglycol

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

- 35 F5: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g C2,C6-disubstituovaného-9-benzyl-9H-purinu jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

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

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

- 50 Příklad 22 – Formulace tablety s řízeným uvolňováním

Jedna tableta obsahuje například 300 až 350 mg C2,C6-disubstituovaného-9-benzyl-9H-purinu jako účinnou látku.

Pomocná látka se známým účinkem: Jedna tableta obsahuje 150 až 200 mg retardující složky (Methocel, Parateck® SRP 80, Kollidon® SR, Kollidon 25, chitosan, alginát), dále lubrikantu (stearát hořečnatý), účinné látky (VH), pojiva (Prosolv SMCC 90).

- 5 Lékovou formou je tableta s řízeným uvolňováním.

Příprava tabletoviny: Tablety jsou připraveny přímým lisováním. Nejprve je naváženo vypočtené množství retardující složky (Methocel, Parateck® SRP 80, Kollidon® SR, Kollidon 25, chitosan, alginát), dále lubrikantu (stearát hořečnatý), účinné látky (VH), pojiva (Prosolv SMCC 90).

- 10 Následně je vzniklá směs homogenizována v homogenizátoru (Retsch MM200 – Retsch GmbH, Haan). Homogenizaci se doporučuje provádět ve třech frekvencích: 10 kmitů/s, 13 a 15 kmitů/s vždy po dobu 1 minuty. Tabletovina je poté převedena do ručního lisu. Tablety jsou lisovány při zatížení 8 kN po dobu 5 minut. Zatížení je zvoleno s ohledem na požadovanou pevnost tablet 0,8 až 0,8 MPa. Hmotnost tablet činí 500 ± 5 mg.

- 15 Hydrofilní matricové tablety s hypromelosou

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše.

- 20 Hmotnost tablet byla 500 ± 5 mg. Složení hydrofilních tablet s hypromelosou v %

Formulace	A1	A2	A3
Prosolv SMCC 90	49	49	49
Methocel K4M	0	30	0
25 Methocel K15M	30	0	0
Methocel K100M	0	0	30
účinná látka	20	20	20
Stearát hořečnatý	1	1	1

- 30 Hydrofilní matricové tablety s retardující složkou Kollidon 25, Kollidon® SR, Parateck® SRP 80

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše.

Hmotnost tablet byla 500 ± 5 mg. Složení hydrofilních tablet v %:

35 Formulace	F1	F2	F3	F4	F5
Prosolv® SMCC 90	49	49	49	49	49
Kollidon 25	30	20	10	0	0
Kollidon® SR	0	0	0	30	0
40 Parateck® SRP 80	0	0	0	0	30
účinná látka	20	30	40	20	20
Stearát hořečnatý	1	1	1	1	1

- 45 Hydrofilní matricové tablety obsahující LubriTose™ MCC, Methocel K15M nebo Methocel K4M

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše.

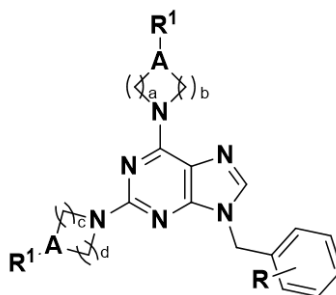
Hmotnost tablet byla 500 ± 5 mg. Složení hydrofilních tablet v %:

50 Formulace	F1	F2
LubriTose™ MCC	50	50
Methocel K15M	30	0
Methocel K4M	0	30
účinná látka	20	20

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu obecného vzorce I,

5



(I),

ve kterém

10

R je vybráno ze skupiny zahrnující H, F, Cl, Br, methyl, OH a methoxy;

kruh $-\text{[N}-(\text{CH}_2)_c\text{-A(R1)-}(\text{CH}_2)_d\text{-}]$ v poloze 2 je vybrán ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, thiomorfolinyl, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepán-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl a 1,5-thiazokan-5-yl;

15

kruh $-\text{[N}-(\text{CH}_2)_a\text{-A(R1)-}(\text{CH}_2)_b\text{-}]$ v poloze 6 je vybrán ze skupiny zahrnující azetidín-1-yl, pyrrolidín-1-yl, piperidín-1-yl, thiomorfolinyl, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepán-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl a 1,5-thiazokan-5-yl;

20

a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami.

2. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu podle nároku 1, nesoucí substituent v poloze 9, tedy substituent $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{R}$, který je vybrán ze skupiny zahrnující benzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl, 4-chlorbenzyl, 2,6-dichlorbenzyl, 2-brombenzyl, 3-brombenzyl, 4-brombenzyl, 2-methylbenzyl, 3-methylbenzyl, 4-methylbenzyl, 2-hydroxybenzyl, 3-hydroxybenzyl, 4-hydroxybenzyl, 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl.

30

3. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu podle nároku 1, vybrané ze skupiny zahrnující 2,6-di(azetidín-1-yl)-9-(3-hydroxybenzyl)-9*H*-purin, 2,6-di(azetidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-9*H*-purin, 9-(4-hydroxybenzyl)-2,6-di(pyrrolidín-1-yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-2-(piperidín-1-yl)-6-(pyrrolidín-1-yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-6-(piperidín-1-yl)-2-(pyrrolidín-1-yl)-9*H*-purin, 9-benzyl-2,6-dithiomorfolino-9*H*-purin, 9-(4-hydroxybenzyl)-2,6-dithiomorfolino-9*H*-purin, 2-(azetidín-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-6-thiomorfolino-9*H*-purin, 9-(4-hydroxybenzyl)-2-(pyrrolidín-1-yl)-6-thiomorfolino-9*H*-purin, 2,6-di(azepán-1-yl)-9-(4-hydroxybenzyl)-9*H*-purin.

35

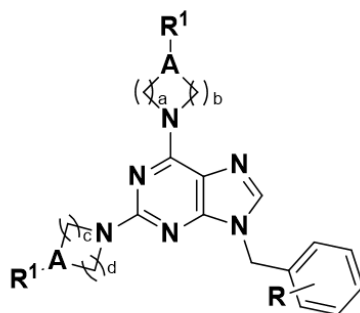
4. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, pro použití jako léčiva.

40

5. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, pro použití pro léčení nebo profylaxi neurodegenerativních onemocnění.

45

6. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu obecného vzorce Ia,



(Ia),

ve kterém

5

R je vybráno ze skupiny zahrnující H, F, Cl, Br, methyl, OH a methoxy;

10 kruh $-\text{[N}-(\text{CH}_2)_c\text{-A(R1)-}(\text{CH}_2)_d\text{-]}$ v poloze 2 je vybrán ze skupiny zahrnující azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolinyl, thiomorfolinyl, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl a 1,5-thiazokan-5-yl;

15 kruh $-\text{[N}-(\text{CH}_2)_a\text{-A(R1)-}(\text{CH}_2)_b\text{-]}$ v poloze 6 je vybrán ze skupiny zahrnující azetidin-1-yl, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl, morfolinyl, thiomorfolinyl, piperazin-1-yl, 4-methylpiperazin-1-yl, azepan-1-yl, azokan-1-yl, 1,5-oxazokan-5-yl a 1,5-thiazokan-5-yl;

15

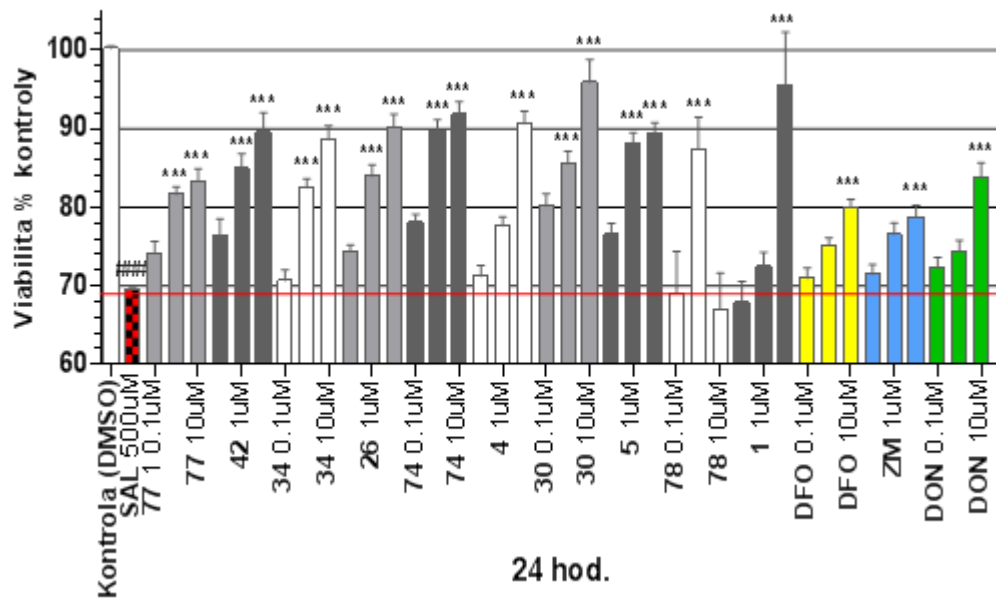
a jejich farmaceuticky přijatelné soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adiční soli s kyselinami.

20 pro použití pro léčení nebo profylaxi neurodegenerativních onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující amyotrofickou laterální sklerózu, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzu, kortikobazální degenerace, frontotemporální demence, Lewyho tělní demence, atrofie mnohočetného systému, chronické traumatické encefalopatie a spinocerebelární ataxie.

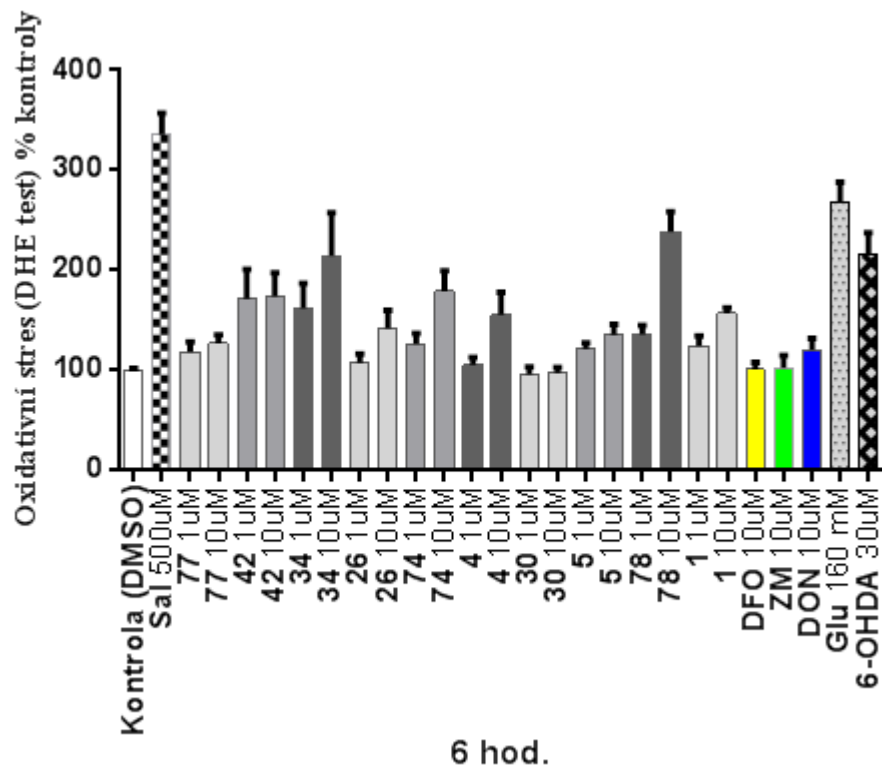
25 7. Farmaceutická kompozice, vyznačená tím, že obsahuje jeden nebo více heterocyklických dusíkatých derivátů purinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, a alespoň jeden farmaceuticky akceptovatelný nosič.

30

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2