

SYNTÉZA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA 2- A 6-C-SUBSTITUOVANÝCH PURINOVÝCH BÁZÍ, NUKLEOSIDŮ A ACYKlickÝCH ANALOGŮ NUKLEOTIDŮ*

MICHAL HOCEK

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
e-mail: hocek@uochb.cas.cz

Došlo dne 19.VI.2000

Klíčová slova: C-substituované puriny, acyklické nukleotidy, acyklické nukleosidy, cytostatika

Obsah

1. Úvod
2. Acyklické analogy nukleotidů odvozené od 2- a 6-(aminoalkyl)purinů
 - 2.1. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 2-(aminomethyl)purinů
 - 2.2. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 6-(aminomethyl)purinů a purin-6-karboxamidinů
 - 2.3. Syntéza acyklických analogů odvozených od 6-(1-aminoethyl)purinů a 6-hetarylpurinů
 - 2.4. Syntéza acyklických analogů nukleotidů odvozených od 2-amino-6-C-substituovaných purinů
 - 2.5. Biologická aktivita připravených látek
3. Rozvoj metodiky cross-coupling reakcí purinů a syntéza 6-C-substituovaných purinových bází a nukleosidů
 - 3.1. Syntéza 6-(perfluoralkyl)purinů a jejich alkylace a glykosidace
 - 3.2. Suzuki-Miyauraova reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami a syntéza a biologická aktivita 6-fenylpurinů
4. Závěr

1. Úvod

Biogenní purinové báze a jejich nukleosidy jsou v polohách 2 a 6 substituovány amino- nebo oxoskupinou, která se účastní tvorby vodíkových vazeb s komplementární bází například s aktivním místem enzymu nebo receptoru. Substitucí těchto skupin je možno připravit látky se širokým spektrem biologické aktivity; např. 6-(alkylamino)puriny (jako analogy cytokininů) vykazují antineoplastickou aktivitu, jejich nukleosidy zase interagují s adenosinovými receptory atd.

Významnou skupinou biologicky aktivních purinových derivátů jsou *N*-(fosfonomethoxyalkyl)puriny, tzv. acyklické analogy nukleotidů¹⁻³, vyvinuté v osmdesátých letech týmem A. Holého. Tyto látky se vyznačují protivirovou, cytostatic-

kou, antiparazitickou a imunomodulační aktivitou. Strukturálně-aktivitní studie těchto látek ukázala^{4,5}, že pro zachování biologické aktivity je nutná přítomnost aminoskupiny v poloze 2 nebo 6. Později se zjistilo, že vysoce biologicky aktivní jsou⁶⁻⁹ i některé 6-((di)alkylamino)purinové deriváty.

Nahrazení amino či (alkylamino)skupiny u obou těchto skupin látek C-substituentem může vést k vyřazení z vodíkových vazeb v případě nefunkcionalizovaného C-substituentu, popř. k možné tvorbě vodíkových vazeb jiného typu v případě funkcionalizovaného substituentu. Kromě toho takovéto C-substituované puriny nemohou být katabolizovány deaminasami a lze tudíž předpokládat jejich větší biologickou stabilitu.

2- a 6-C-substituované puriny byly dříve obvykle připravovány heterocyklizací z pyrimidinů či imidazolů nebo fotochemickou radikálovou substitucí purinů^{10,11}. Heterocyklizační metody byly obvykle mnohastupňové syntézy s nízkými celkovými výtěžky, zatímco fotochemické metody byly značně neselektivní. Až v posledních dvou dekádech se s rozvojem „cross-coupling“^{**} reakcí katalyzovaných komplexy přechodných kovů začaly vyvíjet efektivní metody přímé C-substituce halogenpurinů organokovy. Pro zavedení různých typů C-substituentů bývá výhodné použití různých typů organokovových činidel: arylmagnesiumhalogenidy^{12,13} jsou vhodné pro zavedení některých jednoduchých arylů, stannany a organozinečnatá činidla¹⁴⁻¹⁷ se používají zejména pro zavedení arylů, hetarylů a alkenylů, zatímco kupráty¹⁸⁻²⁰ a trialkylhliníky²¹ pro zavedení alkylových substituentů. K rozvoji této metodologie výrazně přispěla i naše laboratoř.

2. Acyklické analogy nukleotidů odvozené od 2- a 6-(aminoalkyl)purinů

Jak již bylo zmíněno v úvodu, přítomnost 2- nebo 6-amino-, popř. ((di)alkylamino)skupiny na purinovém jádře má důležitou úlohu v biologické aktivitě acyklických analogů nukleotidů. Informace o této úloze by mohly přispět k porozumění mechanismu účinku těchto látek. Pro studium tohoto fenoménu bylo navrženo několik typů modifikovaných analogů těchto látek, které jsou charakterizovány nahrazením (alkylamino)skupiny (*a*) (aminomethyl)skupinou, která může tvořit analogické H-vazby, ale je bazičtější; (*b*) izosterní *N*-substituovanou 1-(aminoethyl)skupinou; (*c*) silně bazičnou karboxamidinovou funkcí; a konečně (*d*) různými typy dusíkatých heterocyklů.

2.1. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 2-(aminomethyl)purinů

Byla vyvinuta originální metoda²² přípravy benzyloxykarbonylem (Cbz) chráněných 2-(aminomethyl)purinových bází

* Přednáška nositele Baderovy ceny za rok 1999, Liblice, 16. 11. 1999

** Nemá český ekvivalent; jde o tvorbu C-C vazby mezi dvěma různými organickými zbytky; běžně se tento termín používá pro reakce organického elektrofilu s organokovem

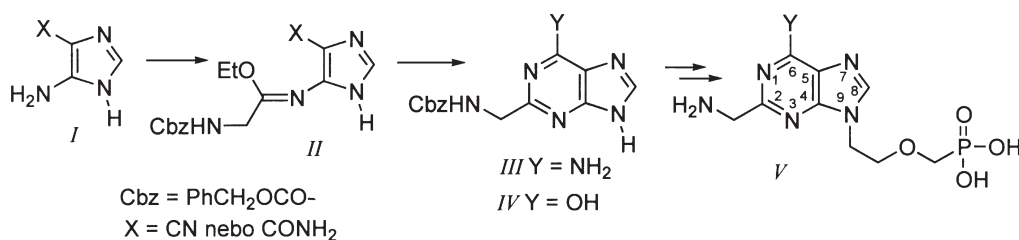


Schéma 1

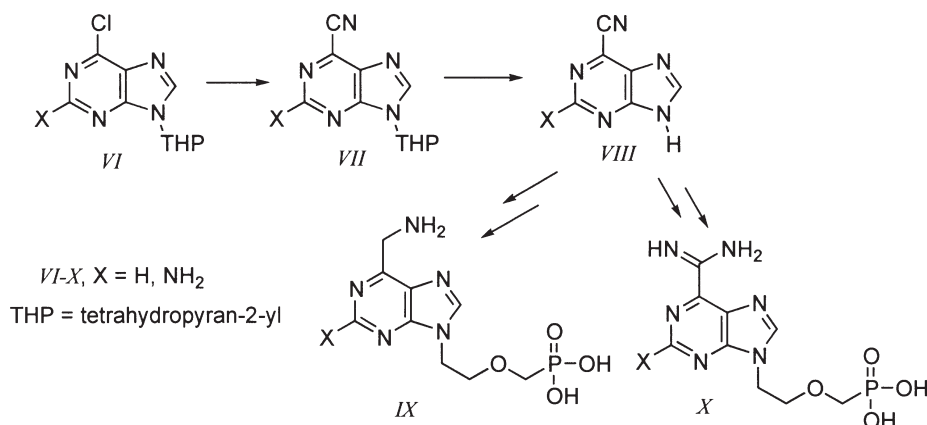


Schéma 2

III heterocyklizací derivátů 4-aminoimidazol-5-karboxylové kyseliny I s Cbz-chráněným aminoorthoacetátem vedoucí kvantitativně k imidátovým intermediátům II, které byly bazicky cyklizovány na puriny (schéma 1). Tato metoda umožnila efektivní přípravu chráněných 2-(aminomethyl)adeninu a 2-(aminomethyl)hypoxanthinu v multigramovém měřítku. Alkylace²³ 2-(Cbz-aminomethyl)adeninu IV fosfonomethoxyalkylačními činidly za přítomnosti NaH probíhala regioselectivně za vzniku žádaných N-9 substituovaných derivátů. Analogická alkylace 2-(aminomethyl)hypoxanthinu však byla neúspěšná. Příslušné hypoxanthinové deriváty byly tedy připraveny oxodeaminací derivátů adeninových. Použitím jod(trimethyl)silanu byly současně odštěpeny isopropylesterové skupiny fosfonátu a Cbz skupina za vzniku požadovaných volných fosfonátů V.

2.2. Syntéza acyklických nukleotidů odvozených od 6-(aminomethyl)purinů a purin-6-karboxamidinů

K přípravě cílových sloučenin byl navržen postup vycházející z 6-kyanopurinových bází VIII. Tyto klíčové látky byly získány zlepšenou metodou²⁴ spočívající v reakci tetrahydropyran-2-yl (THP) chráněných 6-chlorpurinů VI s tetraethylamonium kyanidem za přítomnosti 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]oktanu (DABCO) v acetonitrilu za pokojové teploty. Příslušné chráněné 6-kyanopuriny VII byly získány ve vysokých výtěžcích (schéma 2). THP skupiny těchto intermediátů byly kvantitativně odštěpeny za mírných podmínek ionexem v H⁺ cyklu (Dowex 50X8) v methanolu. Takto byl snadno získán 6-kyanopurin a 2-amino-6-kyanopurin v multigramových množstvích. Oba 6-kyanopuriny VIII byly potom selektivně alkylovány^{25,26} fosfonomethoxyalkylačními činidly za přítomnosti uhličitanu cesného za vzniku žádaných N-9 sub-

stituovaných 6-kyanopurinových derivátů. Ty pak byly podrobeny katalytické hydrogenaci následované reakcí s brom-(trimethyl)silanem (TMSBr) a poskytly cílové fosfonáty 6-(aminomethyl)purinů IX. Získané chráněné 6-kyanopurinové intermediáty byly také využity k přípravě 6-karboxamidinopurinových derivátů X sledem reakcí s methoxidem sodným, chloridem amonným a TMSBr.

2.3. Syntéza acyklických analogů odvozených od 6-(1-aminoethyl)purinů a 6-hetarylpurinů

Stilleho reakce příslušných 6-chlorpurinových fosfonátů XIa a XIc s (1-ethoxyvinyl)tributylstannanem poskytla 6-(1-ethoxyvinyl)puriny XII, které byly následně hydrolyzovány na 6-acetylpuriny XIII (schéma 3). Reduktivní aminace těchto látek působením NaBH₃CN za přítomnosti primárních a sekundárních amin hydrochloridů následovaná odchráněním umožnila přípravu²⁷ série N-substituovaných 6-(1-aminoethyl)purinových acyklických nukleosidů XIV. Cross-coupling reakce 6-jod-9-[2-(diethoxyfosforylmethoxy)ethyl]purinu XIb s různými heteroarylstannany a heteroarylzinečnatými činidly za katalýzy Pd(PPh₃)₄ poskytly²⁸ sérii 6-hetarylpurinových derivátů v dobrých výtěžcích. Výsledné chráněné 6-hetarylpurinové meziproducty byly standardním způsobem deblokovány na volné fosfonáty XV.

2.4. Syntéza acyklických analogů nukleotidů odvozených od 2-amino-6-C-substituovaných purinů

Vzhledem k již zmiňované důležité úloze aminoskupiny v biologické aktivitě této skupiny látek, byla dalším logickým

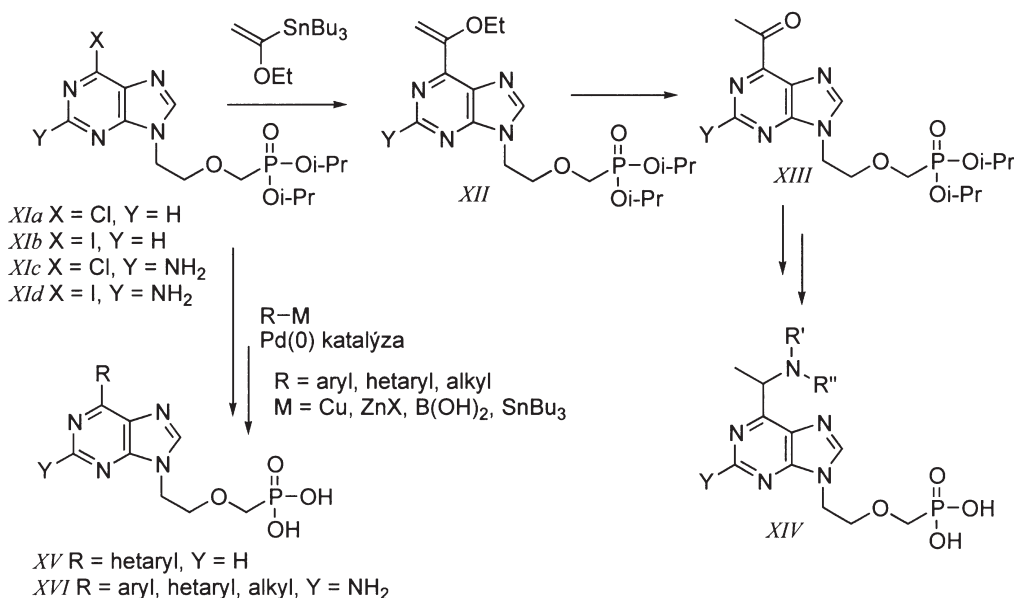


Schéma 3

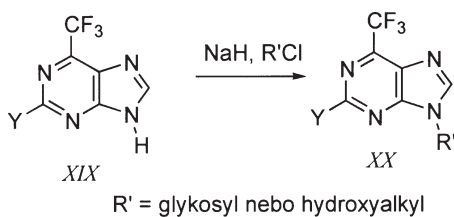
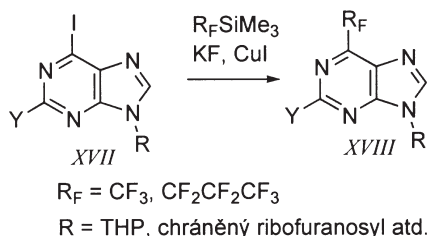


Schéma 4

pokračováním projektu systematická příprava a studium protivirové aktivity 2-amino-6-*C*-substituovaných purinových derivátů²⁹. Byly studovány cross-coupling reakce 6-chlor- a 6-jodpurinových derivátů *XIc* a *XI d* s různými typy organokovů (schéma 3). Chlorpurinový derivát *XIc* reagoval s trialkylhliníky a arylboronovými kyselinami za vzniku příslušných 6-*C*-substituovaných produktů *XVI*, zatímco pro reakce s hetarylzinečnatými činidly a hetarylstannany bylo nutno použít reaktivnější 6-jodpurinový derivát *XI d*. Perfluoralkylkupráty generované *in situ* z perfluoralkylsilanů pomocí KF a CuI reagovaly s 6-jodpurinovým derivátem *XI d* za vzniku 6-perfluoralkylpurinů v nízkých výtěžcích.

2.5. Biologická aktivita připravených látek

Všechny výše uvedené acyklické nukleotidy byly testovány na protivirovou aktivitu. Ukázalo se, že pouze látky nesoucí funkcionalizovaný *C*-substituent (aminomethyl, hyd-

roxyethyl, heptafluorpropyl) v poloze 6 a současně aminoskupinu v poloze 2 si částečně zachovávají biologickou aktivitu. Definitivní strukturálně aktivní závěry z tohoto stále ještě probíhajícího projektu však bude možno učinit až v budoucnu v kontextu s rozsáhlými sériemi biologicky aktivních acyklických analogů nukleotidů připravených ve skupině A. Holého.

3. Rozvoj metodiky cross-coupling reakcí purinů a syntéza 6-*C*-substituovaných purinových bází a nukleosidů

Kromě výše uvedených metod, zaměřených na syntézu acyklických analogů nukleotidů jako potenciálních protivirových látek, byl naším cílem také obecný rozvoj metodiky cross-coupling reakcí halogenpurinů s organokovy a použití této metodiky pro syntézu 6-*C*-substituovaných purinových bází a nukleosidů cílených především na možnou antineoplastickou aktivitu.

3.1. Syntéza 6-(perfluoralkyl)purinů a jejich alkylace a glykosidace

Byla vyvinuta originální metoda³⁰ perfluoralkylace 6-jodpurinů *XVII* použitím perfluoralkyl(trimethyl)silanů za přítomnosti CuI a KF (schéma 4). Vlastním perfluoralkylačním činidlem je *in situ* vytvořený perfluoralkyl kuprát. Tato metoda je velmi efektivní zejména pro trifluormethylaci 6-jodpurinových derivátů. Trifluormethylace 2-amino-6-jodpurinů a perfluoralkylace vyššími perfluoralkylsilany probíhá s nižšími výtěžky. Touto metodou byla připravena série 6-(trifluormethyl)- a 6-(heptafluorpropyl)purinových bází, nukleosidů a acyklických nukleotidů *XVIII*. U všech připravených látek byla testována biologická aktivita. Zatímco u 9-(β-D-ribofuranosyl)-6-(trifluormethyl)purinu byla nalezena významná cytostatická aktivita (IC₅₀ = 0,45–2,5 μmol.l⁻¹) proti několika buněčným kulturám lidských nádorů a leukémií, ostatní látky

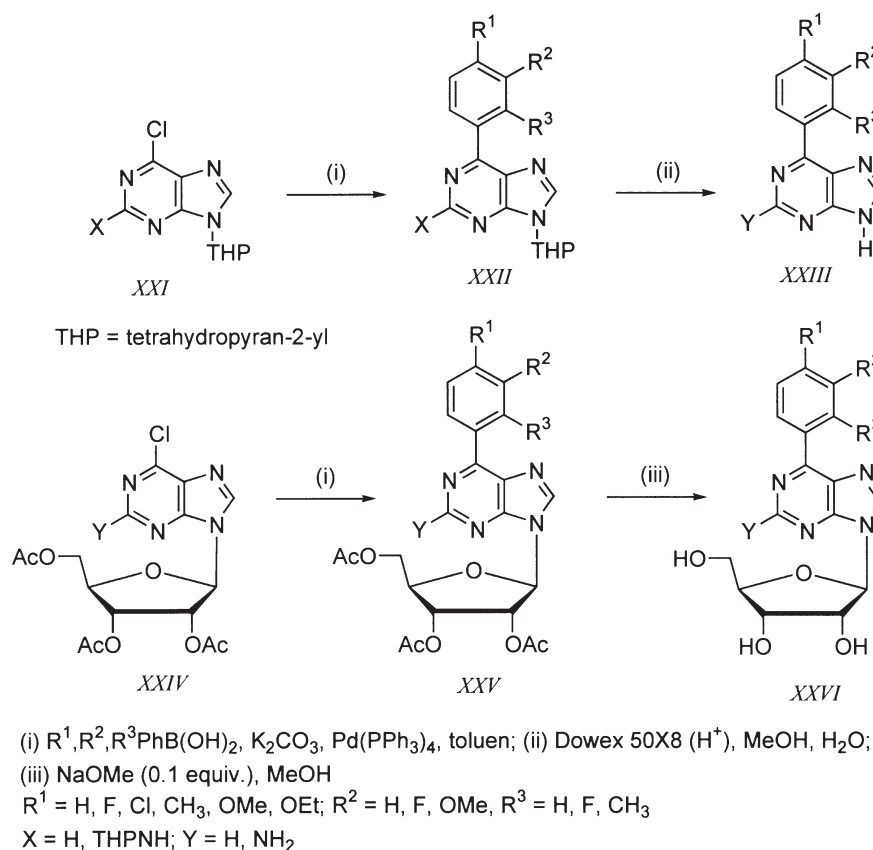


Schéma 5

byly inaktivní. Proto se jevílo zajímavé připravit sérii různých nukleosidů a acyklických nukleosidů odvozených od 6-(trifluormethyl)purinu XIX. Tato báze výše zmíněnou metodou dostupná v multigramovém množství, sloužila jako výchozí látka pro alkylační a glykosylační reakce. Tyto reakce probíhaly regio- a stereoselektivně za vzniku pouze N-9 substituovaných derivátů a β -anomerů v případě nukleosidů. Takto byla připravena³¹ série: 9-(β -D-ribofuranosyl)-, 9-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-, 9-(β -D-arabinofuranosyl)-, 2,3-dihydroxypropyl- a (2-hydroxyethyl)oxymethylderivátů 6-(trifluoromethyl)purinu XX. Překvapivě, kromě již zmíněného ribonukleosidu, ostatní deriváty byly inaktivní, což svědčí o velmi úzké strukturální specifitě cytostatické aktivity této skupiny látek.

3.2. Suzuki-Miyaurova reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami a syntéza a biologická aktivita 6-fenylpurinů

Ve spolupráci s týmem D. Dvořáka byla vyvinuta originální metoda³² 6-C-substituce purinů aplikací Suzuki-Miyaurovy reakce 6-halogenpurinů s boronovými kyselinami. Tato velmi používaná reakce dosud nebyla nikdy úspěšně aplikována v chemii purinů. Optimalizací byly nalezeny dvojce reakční podmínky, za nichž reakce probíhá různým způsobem. Použití bezvodých podmínek v toluenu je velmi vhodné k reakcím fenyloboronových kyselin nesoucích elektroneutrální, elektrondonorní nebo slabě elektronakceptorní substituenty,

zatímco použití vodných podmínek je vhodné k reakcím alkyloboronových kyselin a fenyloboronových kyselin nesoucích elektronakceptorní substituent. Za bezvodých podmínek byla použitím série komerčně dostupných substituovaných fenyloboronových kyselin připravena³³ velká řada substituovaných 6-fenylpurinových bází XXIII a nukleosidů XXVI (schéma 5). Substituované 6-fenyl-9-(β -D-ribofuranosyl)puriny XXVI ($Y = \text{H}$) vykazovaly významnou cytostatickou aktivitu *in vitro* ($\text{IC}_{50} = 0,25\text{--}10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Studie dalších specificky substituovaných derivátů tohoto typu teprve probíhají.

4. Závěr

Byly vyvinuty efektivní metody přípravy 2- a 6-C-substituovaných purinových derivátů a aplikovány pro přípravu purinových bází, nukleosidů a acyklických analogů nukleotidů. Zatímco u připravených acyklických analogů nukleotidů byly nalezeny pouze marginální protivirové aktivity u několika látek, mezi připravenými nukleosidy byla objevena nová skupina látek s významnou cytostatickou aktivitou – 6-fenylpurinové ribonukleosidy. Systematické studium ve všech zmiňovaných oblastech stále pokračuje.

Autor děkuje všem spolupracovníkům. Největší dík patří dr. A. Holému za odborné vedení během disertační práce a za cenné rady a spolupráci v pozdějších fázích projektu. Na některých částech tohoto projektu se podíleli Ing. M. Česnek, doc. D. Dvořák, Ing. M. Havelková a dr. D. Hocková (chemie),

dr. H. Dvořáková a dr. M. Masojídková (NMR spektroskopie) a dr. G. Andrei, prof. J. Balzarini, prof. E. De Clercq, dr. R. Snoeck a dr. I. Votruba (studium biologické aktivity). Práce byla podporována granty GA ČR: 203/93/0118, 203/96/0005, 203/96/K001, 203/98/P027 a 203/00/0036 a firmou Gilead Sciences (U.S.A.).

LITERATURA

- Holý A., v knize: *Advances in Drug Design* (De Clercq E., ed.), sv. 1, str. 179. JAI Press Inc., Greenwich 1993.
- Holý A., Dvořáková H., Jindřich J., v knize: *Antibiotics and Antiviral Compounds* (Krohn K., Kirst H. A., Maag H., ed.), str. 455. Verlag Chemie, Berlin 1993.
- De Clercq E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 449 (1998).
- Holý A., Votruba I., Merta A., Černý J., Veselý J., Šedivá K., Rosenberg I., Otmar M., Hřebabecský H., Trávníček M., Vonka V., Snoeck R., De Clercq E.: *Antiviral Res.* 13, 295 (1990).
- Holý A., Günter J., Dvořáková H., Masojídková M., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., De Clercq E.: *J. Med. Chem.* 42, 2064 (1999).
- Meerbach A., Neyts J., Holý A., Wutzler P., De Clercq E.: *Antivir. Chem. Chemother.* 9, 275 (1998).
- Holý A., Zídek Z., Votruba I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61 (Special Issue), S182 (1996).
- Zídek Z., Holý A., Franková D.: *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 587 (1997).
- Otová B., Zídek Z., Holý A., Votruba I., Sladká M., Marinov I., Leskova V.: *In Vivo* 11, 163 (1997).
- Shaw G., v knize: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Katritzky A. R., Rees C. W., Scriven F. V., ed.), sv. 7. Pergamon Press, London 1994.
- Ewing D. F., Mackenzie G., v knize: *Second Supplements to the 2nd Edition of Rodd's Chemistry of Carbon Compounds* (Sainsbury M., ed.), sv. IV K(partial)/L. Elsevier Science, Amsterdam 1999.
- Bergstrom D. E., Reddy P. A.: *Tetrahedron Lett.* 23, 4191 (1982).
- Estep K. G., Josef, K. A., Bacon E. R., Carabates P. M., Rumney S. IV, Pilling G. M., Krafte D. S., Volberg W. A., Dillon K., Dugrenier N., Briggs G. M., Canniff P. C., Gorczyca W. P., Stankus G. P., Ezrin A. M.: *J. Med. Chem.* 38, 2582 (1995).
- Gundersen L.-L.: *Tetrahedron Lett.* 35, 3155 (1994).
- Gundersen L.-L., Bakkestuen A. K., Aasen A. J., Overas H., Rise F.: *Tetrahedron* 50, 9743 (1994).
- Gundersen L.-L., Langli G., Rise F.: *Tetrahedron Lett.* 36, 1945 (1995).
- Van Aerschot A. A., Mamos P., Weyns N. J., Ikeda S., De Clercq E., Herdewijn P.: *J. Med. Chem.* 36, 2938 (1995).
- Mc Kenzie T. C., Glass D.: *J. Heterocycl. Chem.* 24, 1551 (1987).
- Dvořáková H., Dvořák D., Holý A.: *Tetrahedron Lett.* 37, 1285 (1996).
- Dvořáková H., Dvořák D., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 63, 2065 (1998).
- Hirota K., Kitade Y., Kanbe Y., Maki Y.: *J. Org. Chem.* 57, 5268 (1992).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Synthesis* 1994, 1401.
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 875 (1995).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 60, 1386 (1995).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., De Clercq E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1525 (1996).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61 (Special Issue), S55 (1996).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Tetrahedron* 53, 2291 (1997).
- Hocek M., Masojídková M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62, 136 (1997).
- Česnek M., Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65, 1357 (2000).
- Hocek M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 229 (1999).
- Hocková D., Hocek M., Dvořáková H., Votruba I.: *Tetrahedron* 55, 11109 (1999).
- Havelková, M., Hocek, M., Česnek, M., Dvořák, D.: *Synlett* 1999, 1145.
- Hocek M., Holý A., Votruba I., Dvořáková H.: *J. Med. Chem.* 43, 1817 (2000).

M. Hocek (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Synthesis and Biological Activity of 2- and 6-C-Substituted Purine Bases, Nucleosides and Acyclic Nucleotide Analogues (Bader Award Lecture)**

An overview of the author's recent achievements in the synthesis 2- and 6-C-substituted purines. Diverse approaches consisting mainly in heterocyclization, nucleophilic substitution and cross-coupling reactions were applied to the preparation of the title purines which were further transformed to target nucleosides and nucleotide analogues. Biological activity of the analogues is discussed.