

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 894

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-88**
(22) Přihlášeno: **08.02.2013**
(40) Zveřejněno: **20.08.2014**
(Věstník č. 34/2014)
(47) Uděleno: **19.07.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **30.08.2017**
(Věstník č. 35/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

Trova et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 19, Issue 23, 1 December 2009, Pages 6608-6612;
Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I.
sloučenina 13e, tabulka 1; Trova M et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 19, Issue 23, 1 December 2009, Pages 6613-6617;
Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II
sloučenina 18d.
WO 03/022219 A2; US 2013/0005747 A1.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
BioPatterns, s. r. o., Olomouc, Holice, CZ

(72) Původce:

Tomáš Gucký, Rožnov pod Radhoštěm, CZ
Radek Jorda, Olomouc, CZ
Marek Zatloukal, Šumperk, CZ
Vladimír Kryštof, Olomouc, CZ
Lucie Rárová, Příbor, CZ
Eva Řezníčková, Olomouc, CZ
Wolfgang Mikulits, 1140 Wien, AT
Miroslav Strnad, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:

**2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-
cyklopentyl-9H-purinové deriváty, jejich
použití jako léčiva a farmaceutické
přípravky tyto sloučeniny obsahující**

(57) Anotace:

Řešení se týká nových 2-substituovaných 6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů vykazujících aktivitu jako specifické inhibitory růstu a angiogeneze hepatocelulárních karcinomů. Řešení dále zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující 2-substituované 6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny.

CZ 306894 B6

2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinové deriváty, jejich použití jako léčiva a farmaceutické přípravky tyto sloučeniny obsahující

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká nových 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů, vykazujících aktivitu jako specifické inhibitory růstu a angiogeneze hepatocelulárních karcinomů, a jejich použití jako léčiv.

10

Dosavadní stav techniky

Hepatocelulární karcinomy (HCC) patří mezi nejčastější maligní onemocnění ve světě (El-Serag & Rudolph, 2007, Gastroenterology, 132(7):2557–76). Mezi nejběžnější faktory vzniku HCC patří infekce virem hepatitidy, chronické nadměrné požívání alkoholu, toxiny životního prostředí, hemochromatóza, deficiencie α 1-antitrypsinu nebo ne-alkoholická onemocnění jater (Farazi & DePinho, 2006, Nat Rev Cancer, 6(9):674–87). Vedle kurativních ošetření HCC cestou chirurgické resekce nebo transplantace jater byla nedávno jako velmi slibná terapeutická možnost vyvinuta targetovaná molekulárně založená terapie. Několik terapeutických agens je v současné době studováno v jednoduché monoterapii nebo v tandemové či kombinatorní cílené terapii s dalšími konvenčními léčivy (Chua & Choo, 2011, Int J Hepatol 348297. Epub 2011 Jul 12; Tanaka & Arii, 2011, J Gastroenterol, 46(3):289–96). Bohužel, řada z těchto léčiv vykazala limitovanou aktivitu vůči HCC, pravděpodobně kvůli relativně vysoké chemorezistenci tohoto typu nádorů.

Inhibice angiogeneze byla rovněž rozpoznána jako racionální způsob léčby z důvodu typické hypervaskularizace HCC nodulů v těchto nádorech (Welker & Trojan, 2011, World J Gastroenterol, 14;17(26):3075–81) a nedávno byly definovány i další nové molekulární cíle, včetně nádorových kmenových buněk, jako budoucí možné strategie pro léčení HCC (Tanaka & Arii, 2011, J Gastroenterol 46(3):289–96). Sorafenib (Nexavar) byl povolen jako první z léčiv pro ošetření rozvinutých stádií HCC, s tím, že je zacílen na široké spektrum kinas zahrnující VEGFR, PDGFR a Raf, které jsou často hyperaktivovány a nadměrně regulovány u HCC. Bohužel je exaktní indikace u sorafenibu velmi nejasná a široká (Kim et al., 2011, Oncology, 25(3):283–91, 295), a proto jsou nové terapeutické strategie pro efektivní léčbu HCC velmi potřebné.

Nedávno byla rovněž zavedena transarteriální chemoembolizace (TACE) pro ošetření neresekovatelných HCC (Llovet & Bruix, 2008, J Hepatol, 48 Suppl 1S20–37), která vedla k efektivní distribuci a vyššímu retenčnímu času obvykle podávaných chemoterapeutik, jakými jsou doxorubicin, cis-platina a epirubicin v nádoru (Llovet & Bruix, 2003 Hepatology, 37(2):429–42; Marelli et al, 2006, Cancer Treat Rev, 32(8):594–606).

Byly rovněž objeveny nové skutečnosti v oblasti patologie maligních hepatocytů reflektujících specifitu progresu HCC (Zijl et al., 2009, Future Oncol, 5(8): 1169–79). Nedávno vytvořený lidský model zahrnující epiteliální mezenchymální přeměnu (EMT) zdůraznil důležitost tohoto procesu zejména ve vztahu k rozšíření a metastatické kolonizaci nádorů, ale umožnil i užitečné vyhodnocení účinnosti léčiv v průběhu progresu HCC (Zijl et al., 2011, Mol Cancer Ther, 10(5):850–60).

Substituce purinového kruhu v pozicích 2, 6 a 9 řadou substituentů byla již uskutečněna a tyto sloučeniny byly rovněž otestovány, např. substituce v pozici N⁶ na benzylu a fenylu založenými sloučeninami (WO 03/040 144, WO 2010 CZ 00067, WO 2010 CZ 00004), substituce ribózou v poloze 9 (WO 2004/058791), substituce méně stericky náročnými substituenty v poloze 2 (WO 2009/003428) a substituce 2-substituovanými benzylovými substituenty v poloze N⁶ (WO 2009/043320). US 696970 B2 se týká rovněž 2,6,9-trisubstituovaných biarylových purino-

55

vých derivátů, které nesou hlavně krátký alkyl v poloze 9 (methyl, ethyl, isopropyl), a jejich použití jako inhibitory CDK1/2 a antiproliferativní sloučeniny. WO 03/022216 A2 a WO 0055161 A1 se rovněž týká 2,6,9-disubstituovaných biarylových adeninových derivátů, které nesou isopropylou skupinu v pozici 9, a jejich použití pro několik hyperproliferativních onemocnění.

5 Tyto substituce však nevedly k účinným léčivům proti hepatocelulárním karcinómům.

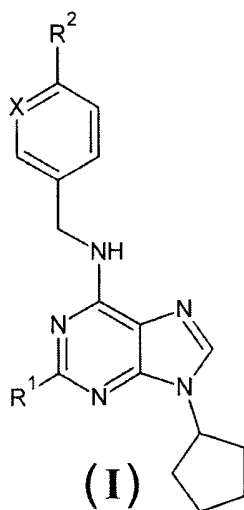
Série nových 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů podle tohoto vynálezu je vhodná pro inhibici růstu a angiogeneze v hepatocelulárních karcinomech. Tato skupina nových purinových derivátů je charakteristická nejen neobvyklou kombinací

10 cytotoxické, antiangiogenní, protizánětlivé a proapoptotické aktivity, která přináší látkám podle tohoto vynálezu nejen silné protinádorové vlastnosti, ale i doposud neznámé typy aktivit (antiangiogenní, protizánětlivá, proapoptotická), které jsou s výhodou využitelné pro léčení hepatokarcinómů, zejména jako protinádorové látky zacílené na metastazující hepatocelulární karcinomy. Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout novou generaci unikátních a velmi účinných protinádorových sloučenin, které mají vysoký index selektivity a účinnosti.

15

Podstata vynálezu

20 Předmětem tohoto vynálezu jsou substituované 2-substituované-6-biarylmethyl-cyklopentyl-9H-puriny obecného vzorce I,



25 ve kterém

X je CH nebo N,

R1 je vybráno ze skupiny zahrnující

30 (4-aminocyklohexyl)amino,
 (2-aminocyklohexyl)amino,
 (3-aminocyklohexyl)amino,
 (4-hydroxycyklohexyl)amino,
 [(2R)-1-hydroxybutan-2-yl]amino,
 (2-hydroxy-2-methylpropyl)amino,
 35 (3-hydroxy-3-methylbutyl)amino,
 [(3S)-2-hydroxy-2,4-dimethylpent-3-yl]amino,
 piperazin-1-yl,
 4-methylpiperazin-1-yl,
 40 morfolin-4-yl,

[(1*S*)-1-(dimethylamino)-2-hydroxyethyl]amino,
 [(3*R*)-2-hydroxypent-3-yl]amino,
 (3-hydroxypropyl)amino,
 (2-aminoethyl)amino,
 5 (3-aminopropyl)amino,
 (2-aminopropyl)amino,
 4-(aminomethyl)piperidin-1-yl,
 (piperidin-4-ylmethyl)amino,
 4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-yl,
 10 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl,

a

R2 je vybráno ze skupiny zahrnující
 15 substituovaný fenyl, ve kterém jsou substituenty v jakékoliv poloze a substituenty jsou vy-
 brány ze skupiny zahrnující OH, OCH₃, NH₂, Cl, Br, F, I, COOH, NO₂,
 2-pyridyl,
 3-pyridyl,
 4-pyridyl,
 20 2-furanyl,
 3-furanyl,
 thien-2-yl,
 thien-3-yl,
 pyrazol-1-yl,
 25 pyrazol-3-yl,
 pyrazol-4-yl,
 pyrrol-1-yl,

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

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

35 Předmětem vynálezu jsou 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puriny
 obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Předmětem vynálezu jsou rovněž 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-
 40 puriny obecného vzorce I pro použití pro inhibici buněčné proliferace a/nebo indukci apoptózy.

Dále jsou předmětem vynálezu 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puri-
 ny obecného vzorce I pro použití pro inhibici angiogeneze.

Předmětem vynálezu jsou i 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puriny
 obecného vzorce I pro použití jako protizánětlivé látky.

45 Předmětem tohoto vynálezu jsou rovněž 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-
 9*H*-puriny obecného vzorce I pro použití při léčbě nádorů, které jsou s výhodou vybrány ze sku-
 piny zahrnující hepatocelulární karcinom a metastazující hepatocelulární karcinom. Předmětem
 tohoto vynálezu jsou dále 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puriny
 obecného vzorce I pro použití při léčbě hepatocelulárních karcinomů, kde tyto látky kombinují
 50 protinádorové, antiangiogenní, protizánětlivé a proapoptotické aktivity. Dalším předmětem toho-
 to vynálezu jsou 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puriny obecného
 vzorce I pro použití při výrobě léčiva pro léčení onemocnění vyznačující se buněčnou proliferací
 a apoptózou, jako například nádorů.

Látky podle předkládaného vynálezu jsou inhibitory cyklin–dependentních kinas vybraných ze skupiny zahrnující cyklin–dependentní kinasy 5, 7, a 9 a erk1 či jejich kombinace. Jsou také schopny indukovat nádorový supresor p53.

- 5 Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutický přípravek obsahující alespoň jeden 2-substituo-
vaný-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-purin obecného vzorce I a farmaceuticky příja-
telný nosič, popřípadě i alespoň jedno další protinádorové agens vybrané ze skupiny zahrnující
cis-platinu, doxorubicin nebo sorafenib.
- 10 Nové sloučeniny mohou být podle tohoto vynálezu použity samotné a nebo jako intermediáty při
přípravě nových sloučenin majících řadu diagnostických, terapeutických a průmyslových použití.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou deriváty obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující:

- 15 N^2 -amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(4-amino-cyklohexyl)-9H- N^6 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^2 -(3'-fluoro-bifenyl-4-
20 ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^2 -(2'-methoxy-bi-
fenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^2 -(2'-
hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklo-
pentyl- N^2 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-
cyklopentyl- N^2 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4'-{[2-4-amino-cyklohexyl-
25 amino]-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, N^2 -(4-
amino-cyklohexyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-
diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-
9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-
30 ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-
pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-
(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-
cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-ami-
no-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-
35 diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-yl-
methyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-1-yl-
pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-(5-{[2-(4-amino-cyklohexylamino)-9-cyklo-
pentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, N^2 -(2-amino-cyklo-
hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklo-
40 hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklo-
hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklo-
hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklo-
hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklo-
hexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-
45 cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-di-
amin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-
2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-
2,6-diamin, 4'-{[2-(2-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-
50 methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-
ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -
(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-6H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-
cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-
cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
55 (2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-

diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-yl-methyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-(5-{[2-(2-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, N -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-{[2-(3-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-(5-{[2-(3-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-amino]-cyklohexanol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-amino]-cyklohexanol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-amino]-cyklohexanol, 4-[9-cyklopentyl-6-(3-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-amino]-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-cyklohexanol, 4-{[9-cyklopentyl-2-(4-hydroxy-cyklohexylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(4-hydroxy-cyklohexyl-amino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, (9-cyklopentyl-2-

morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-furany-2-yl-benzyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-furan-3-yl-benzyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(3'-fluoro-bifeny-4-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(2'-methoxy-bifeny-4-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(2'-hydroxy-bifeny-4-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(2'-amino-bifeny-4-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-amin, 4'-[(9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-ylamino)-methyl]-bifeny-4-karboxylová kyselina, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin, (9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, 4-{5-[(9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-ylamino)-methyl]-pyridin-2-yl}-benzoová kyselina, 1-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol, 1-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol, 1-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol, 1-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol, 4'-{[9-cyklopentyl-2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifeny-4-karboxylová kyselina, 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 1-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-propan-2-ol, 1-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-propan-2-ol, 1-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-propan-2-ol, 1-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-propan-2-ol, 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(2-hydroxy-2-methyl-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifeny-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol, 4'-{[9-cyklopentyl-2-(3-hydroxy-3-methyl-butylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifeny-4-karboxylová kyselina, 4-{9-

cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-butan-2-ol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-butan-2-ol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-butan-2-ol, 4-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-2-methyl-butan-2-ol, 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(3-hydroxy-3-methyl-butylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4'-{[2-(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, N^2 -(2-amino-propyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-(5-{[2-(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl amino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4'-{[2-(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, N^2 -(3-amino-propyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-

amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^2 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-
 diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-
 9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-4-(5-{[2-(3-
 amino-propyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina,
 5 N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
 (2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
 (amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-
 amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-
 ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-
 10 9-cyklopentyl- N^6 -(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-
 9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-
 ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-
 amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
 (2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4'-{[2-(2-
 amino-ethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina,
 15 N^2 -(2-amino-ethyl)- N^6 -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin,
 N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-
 diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-
 purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^2 -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-
 20 9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^2 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-
 ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-
 pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-
 methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-ethyl)-9-cyklo-
 pentyl- N^6 -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -(2-amino-
 25 ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin, N^2 -
 (2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-di-
 amin, 4-(5-{[2-(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-
 yl)-benzoová kyselina, 3-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-
 amino]-propan-1-ol, 3-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl-
 30 amino]-propan-1-ol, 3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-
 propan-1-ol, 3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-propan-
 1-ol, 3-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-
 propan-1-ol, 3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl-
 amino}-propan-1-ol, 3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-
 35 purin-2-ylamino}-propan-1-ol, 3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-
 9H-purin-2-ylamino}-propan-1-ol, 3-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-
 purin-2-ylamino]-propan-1-ol, 4'-{[9-cyklopentyl-2-(3-hydroxy-propylamino)-9H-purin-
 6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, 3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-
 pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-propan-1-ol, 3-{9-cyklopentyl-6-[(6-
 40 thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-propan-1-ol, 3-{9-cyklo-
 pentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-propan-1-ol, 3-
 {9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-
 propan-1-ol, 3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-
 purin-2-ylamino)-propan-1-ol, 3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-yl-
 45 methyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-propan-1-ol, 3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-
 fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-propan-1-ol, 3-(9-cyklopentyl-6-
 {[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-propan-1-ol, 3-{9-
 cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-propan-
 1-ol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(3-hydroxy-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyri-
 50 din-2-yl)-benzoová kyselina, (R)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-
 purin-2-ylamino]-pentan-2-ol, (R)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-
 purin-2-ylamino]-pentan-2-ol, (R)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-
 purin-2-ylamino]-pentan-2-ol, (R)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-
 purin-2-ylamino]-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-
 55 amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-

4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-pentan-2-ol, 4'-{[9-cyklopentyl-2-((R)-1-ethyl-2-hydroxy-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, (R)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-pentan-2-ol, (R)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-pentan-2-ol, (R)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-pentan-2-ol, (R)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-pentan-2-ol, (R)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-pentan-2-ol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-((R)-1-ethyl-2-hydroxy-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-4-pyridin-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-3-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-amin, 4'-{[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, [2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-pyridin-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-2-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-3-yl-benzyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-amin, 4'-{[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, [2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-

yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-amin, [9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4'-({9-cyklopentyl-2-[(piperidin-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-6-ylamino}-methyl)-bifenyl-4-karboxylová kyselina, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-*N*⁶-piperidin-4-ylmethyl-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-*N*⁶-piperidin-4-ylmethyl-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-*N*⁶-piperidin-4-ylmethyl-9H-purin-2,6-diamin, 9-cyklopentyl-*N*²-piperidin-4-ylmethyl-*N*⁶-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin, 4-[5-({9-cyklopentyl-2-[(piperidin-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-6-ylamino}-methyl)-pyridin-2-yl]-benzoová kyselina, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-pyridin-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(3'-fluoro-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol, 4'-{[9-cyklopentyl-2-((R)-1-hydroxymethyl-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, (R)-2-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol, (R)-2-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol, (R)-2-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol, (R)-2-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol, (R)-2-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-butan-1-ol, 4-(5-{[9-cyklopentyl-2-((R)-1-hydroxymethyl-propylamino)-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-

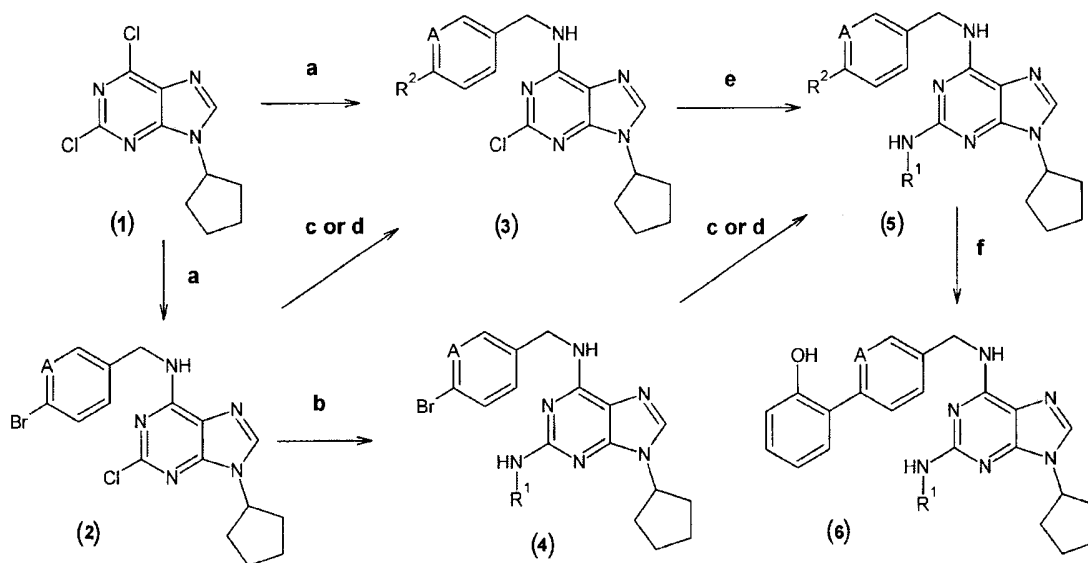
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

ethoxy]-ethanol, 2-[2-(4-{9-cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethoxy]-ethanol,

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

Obecné syntetické přístupy

Sloučeniny podle tohoto vynálezu byly připraveny konvenčními chemickými postupy vyznačujícími se vysokou variabilitou substituentů v polohách 2 a 6 purinové molekuly. Použité syntetické postupy jsou znázorněny v obecném schématu 1.



A = C nebo N

Reaktanty a podmínky:

a: příslušný amin, DIPEA, *n*-propanol, 120 °C (zatavená trubice), 4 až 8 h

b: *trans*-1,4-diaminocyclohexan, 160 °C (zatavená trubice), 4 h

c: příslušná arylboronová kyselina, Pd(OAc)₂, K₃PO₄, TBAB, DMF, 80 až 120 °C, 4 až 48 h

d: příslušná arylboronová kyselina, Pd(dba)₂, PPh₃, Na₂CO₃, DME, voda, 80 °C, 8 až 16 h

e: příslušný amin, DIPEA, NMP, 160 °C, 4 až 72 h

f: 1. BBr₃, DCM, 2. methanol

Syntéza začíná z komerčně dostupného 2,6-dichloropurinu, který jev prvním kroku alkylován Mitsunobuovou alkylací za vzniku 9-cyklopentyl-2,6-dichloro-9H-purinu (1) jenž je následně reagován s příslušným 4-brombenzylaminem, resp. C-(6-brom-pyridin-3-yl)methylaminem za vzniku sloučeniny vzorce 2. V některých případech byla také provedena reakce přímo s příslušným 1-(subst.bifenylo)methanaminem nebo 1-[4-(heteroaryl)fenyl]methanaminem, resp. 1-[6-(subst.fenyl)pyridin-3-yl]methanaminem nebo 1-[6-(heteroaryl)pyridin-3-yl]methanaminem za vzniku sloučeniny obecného vzorce 3. Substituce atomu chloru v poloze 2 purinové molekuly probíhá v případě sloučenin obecného vzorce 2, resp. 3, za velkého přebytku příslušného aminu v přítomnosti silné báze a při teplotě 160 °C za vzniku sloučeniny obecného vzorce 4, resp. 5. Tvorba C-C vazeb za podmínek Suzukiho reakce sloučenin obecného vzorce 2, resp. 4, s příslušným arylem, resp. heteroaryl boritou kyselinou, postupuje pozvolna dokonce i v přítomnosti atomu chloru u sloučenin obecného vzorce 2 a 3, resp. 5. Demethylace sloučeniny obecného vzorce 6, ve které je R² 2-methoxyfenylová skupina, je dosaženo při použití bromidu boritého v dichlormethanu za mírných podmínek.

Terapeutické přípravky

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy. Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovač a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspenze 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, brsidovou a linoleovou, případně s přidávkou antioxidantů, např. vitaminu E, β -karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, "Labrafil M 2375" (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), "Labrafil M 1944 CS" (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholovou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), "Labrasol" (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholovou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; 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 olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejně.

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

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

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózy preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan 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, zesílený 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 horečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

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

- 15 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 horečnatý, 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
20 či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

- Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo
25 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalně koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

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

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

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

- 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
50 přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Objasnění výkresů

Obr. 1 shrnuje výsledky indukce apoptózy v různých nádorových liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu ovlivněných látkou BP14. Asynchronní buňky byly na dobu 24 hodin vystaveny působení různých koncentrací látky BP14 a pomocí imunoblottingu poté byla sledována míra štěpení proteinu PARP-1 a hladina antiapoptotického proteinu Mcl-1. Pro potvrzení rovnoměrného nanesení vzorků byla detekována hladina aktinu.

Obr. 2 ukazuje indukci apoptózy v různých nádorových liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu ovlivněných látkou BP14. Aktivita kaspas-3/7 byla měřena pomocí fluorogenního substrátu Ac-DEVD-AMC v lyzátech buněk vystavených působení látky BP14 o vzrůstající koncentraci.

Obr. 3 shrnuje výsledky inhibice transkripce v různých nádorových liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu ovlivněných látkou BP14 pomocí imunoblottingu. Pro potvrzení rovnoměrného nanesení vzorků byla detekována hladina aktinu. Obr. 4 ukazuje vliv 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů na migraci endoteliálních buněk pupečníkové žíly (HUVECs – human umbilical vein endothelial cells). Míra migrace je určena s využitím "in house" jako procento pixelů fotky, které není pokryto buňkami. (A) kontrolní buňky; (B) pozitivní kontrola (buňky kultivovány bez přítomnosti fetálního séra); (C) buňky ovlivněné látkou BP30 (100 nM); (D) buňky ovlivněné látkou BP36 (100 nM).

Obr. 5 shrnuje výsledky působení látek BP14 a BP20 v angiogenním testu, tzv. tube formation. Buňky HUVEC byly vysazeny na Matrigel a kultivovány po dobu 24 hodin v přítomnosti látek BP14 a BP20. Po uplynutí doby inkubace byla sledována tvorba kapilární sítě.

Obr. 6 shrnuje míru exprese proteinu ELAM-1 v buňkách HUVEC ovlivněných nanomolárními koncentracemi studovaných sloučenin po dobu 4 hodin. Data jsou uvedena jako průměr a směrodatná odchylka tří nezávislých experimentů.

Obr. 7 ukazuje snížení viability buněk karcinomu jater a inhibici CDK působením látky BP14. (A) koncentrační závislost účinku BP14 na viabilitu lidských jaterních nádorových buněk HepG2, PLC, Hep3B a 3sp; (B) inhibice aktivity CDK1 a CDK2 látkou BP14 v nebuněčných extraktech; (C) potlačení aktivity CDK7 a CDK9 v buňkách HepG2 a PLC po 24 hodinovém ovlivnění různými koncentracemi BP14. Analýza pomocí imunoblottingu ukazuje, že aktivita CDK7 a CDK9 koresponduje s fosforylací RNA polymerázy II na serinu 5 a serinu 2. Exprese aktinu potvrzuje rovnoměrné nanesení proteinových vzorků, c, kontrola (neovlivněné buňky). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku alespoň tří nezávislých experimentů.

Obr. 8 ukazuje, že BP14 brání tvorbě kolonií a progresi buněčného cyklu buněk odvozených od hepatocelulárního karcinomu. (A) kvantitativní vyhodnocení kolonií nabarvených krystalovou violetí vytvořených buňkami linie HepG2 (levý panel) a PLC (pravý panel). Buňky byly ovlivněny různými koncentracemi látky BP14; (B) buňky HepG2 (vlevo) a PLC (vpravo) byly na 24 hodin vystaveny působení BP14 a poté byla analyzována syntéza DNA pomocí inkorporace BrdU; (C) výsledky průtokové cytometrie ukazující distribuci fází buněčného cyklu buněk HepG2 (vlevo) a PLC (vpravo) po ovlivnění různými koncentracemi BP14 po dobu 24 hodin. Obsah buněčné DNA je ukázán ve formě histogramů (horní panel) a procenta buněk v G1, S nebo G2 fázi jsou zobrazena v grafech (spodní panel), c, kontrola (neovlivněné buňky). Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky alespoň tří nezávislých experimentů. Statistická významnost je znázorněna hvězdičkami (***) $p < 0,005$.

Obr. 9 zobrazuje míru proliferace lidských jaterních nádorových buněk po ovlivnění BP14. Proliferační kinetika buněk HepG2, PLC a Hep3B po ovlivnění BP14 v různých koncentracích. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky alespoň tří nezávislých experimentů.

Obr. 10 ukazuje indukci apoptózy BP14 v lidských jaterních nádorových liniích oproti primárním lidským hepatocytům. (A) štěpení proteinu PARP po ovlivnění buněk HepG2 a PLC různými koncentracemi BP14 po dobu 24 hodin; (B) štěpení proteinu PARP (horní panel) a stanovení koncentračně–závislého účinku BP14 na viabilitu (spodní panel) u primárních lidských hepatocytů. Štěpení proteinu PARP u buněk HepG2 je zahrnuto jako pozitivní kontrola. Aktin ukazuje rovnoměrné nanesení vzorků, c, kontrola (neovlivněné buňky). Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky alespoň tří nezávislých experimentů.

Obr. 11 ukazuje vliv BP14 na model xenograftu hepatocelulárního karcinomu. Nádory byly vytvořeny subkutánní injekcí buněk HepG2 a PLC do imunodeficientních SCID myši. Farmakologická intervence byla prováděna u myši s vytvořenými tumory pomocí každodenní intraperitoneální injekce BP14 po dobu 17 dní. (A) velikost nádorů odvozených od linie HepG2 a PLC bez působení látky BP14 (kontrola) a po působení BP14; (B) imunohistochemie ukazující řezy nádorovou tkání po obarvení protilátkou proti BrdU. Vložené obrázky ukazují značení BrdU při větším zvětšení; (C), kvantitativní analýza inkorporace BrdU. c, kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky alespoň tří nezávislých experimentů. Statistická významnost je znázorněna hvězdičkami (* $p < 0,05$, *** $p < 0,005$).

Obr. 12 ukazuje vliv BP14 na redukcí tvorby karcinomu jater indukovaného DEN. Vznik karcinomu jater byl indukován u 14 dní starých myši C57BL/6J jednou injekcí DEN. (A) schéma znázorňující časový plán experimentu. Po 8 měsících byly DEN–indukované myši vystaveny třem desetidenním cyklům ošetření BP14 (zeleně) se dvěma sedmidenními pauzami; (B) reprezentativní morfologie nádorů jater indukovaných DEN (kontrola) a těch, které byly ošetřovány BP14. Bílé kroužky ukazují rakovinné jaterní noduly; (C) průměr jednotlivých nádorových nodulů na povrchu jater byl zaznamenán a znázorněn ve formě grafu. Statistická významnost je znázorněna hvězdičkami (* $p < 0,05$).

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález je dále popsán v následujících příkladech, které nijak neomezují jeho rozsah. Výchozí suroviny pro sloučeniny obecného vzorce I jsou dostupné z komerčních zdrojů (Sigma–Aldrich, Fluka, atd.).

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nebyly korigovány. ^1H NMR spektra byla měřena v CDCl_3 nebo v $\text{DMSO}-d_6$ při 300 K na spektrometru Bruker Avance 300 NMR (300 MHz) v TMS jako interním standardu; chemické posuny jsou popsány v ppm, a vazebné konstanty v Hz. Hmotnostní spektra byla měřena za použití LCQ hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA). Merck silikagel Kieselgel 60 (zrnitost 230 až 400) byl použit na sloupcovou chromatografii. Elementární analýzy (C,H,N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Fison Instruments); jejich hodnoty (C, H, N) dopovídaly vypočteným v rámci přijatelných limitů. Quadropolová hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Micromass ZMD detektoru s ionizací elektrosprayem. Výchozí 2,6–dichlor–9–cyklopentylpurin byl připraven Mitsunobovou alkylační metodou z 2,6–dichloropurinu a cyklopentanolu.

- 1) Shum et al. Nucleos. Nucleot. 20, 2001: 1067 až 1078
- 2) Drezér et al. J. Med. Chem. 44, 2001: 524 až 530

Příprava 9–cyklopentyl–2,6–dichlor–9H–purinu

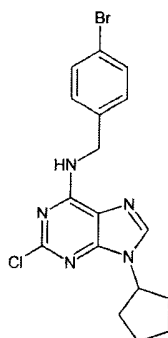
Směs 2,6–dichlor–9H–purinu (30,0 mmol), cyklopentanolu (60,0 mmol) a trifenylofosfinu (36,0 mmol) byla rozpuštěna v suchém tetrahydrofuranu (120 ml) a ochlazená na teplotu 0 °C. K tomuto roztoku byl za míchání a chlazení vodou přidáván po kapkách roztok diisopropyl azodikarboxylátu (36,0 mmol) v dichlormethanu (30 ml) takovou rychlostí, aby teplota nepřesáhla 20 °C. Reakční směs byla poté míchána za laboratorní teploty po argonem po dobu 2 hodin. Poté

byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a odparek byl rozpuštěn ve vroucím toluenu (100 ml). Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok inokulován krystalem trifenyfosfinoxidu a roztok byl ponechán krystalizaci po dobu 24 hodin při teplotě 5 °C. Vyloučený trifenyfosfinoxid byl zfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl konečně krystalován z ethanolu, přičemž byl získán 9-cyklopentyl-2,6-dichlor-9H-purin. Výtěžek: 56 %, t.t.: 118 až 120 °C. Sumární vzorec: C₁₀H₁₀Cl₂N₄ (257,12) Elementární analýza: Vypočteno: C, 46.71; H, 3.92; N, 21.79. Nalezeno: C, 46.95; H, 3.81; N, 21.70. HPLC-MS (ESI+): 288.10 (99.6%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.64–1.69(m, 2H), 1.81–1.96(m, 4H), 2.09–2.15(m, 2H), 4.92(qui, J=7.53, 1H, CH), 8.82(s, 1H, CH).

Příprava C-(6-brom-pyridin-3-yl)methylaminu

2-Brom-5-methyl-pyridin (70,0 mmol) a N-bromsukcinimid (80,0 mmol) byly rozpuštěny v 1,2-dichloroethanu (150 ml) a ke směsi byl přidán 2,2'-azobis(2-ethylpropionitril) (1,50 mmol). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za stálého míchání při teplotě 85 °C, po 15 minutách byla přidána další část 2,2'-azobis(2-methylpropionitrilu) (1,50 mmol) a reakční směs byla zahřívána při teplotě 85 °C dalších 15 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs ponechá stát po dobu 2 hodin při teplotě 5 °C a vyloučená sraženina se zfiltruje a promyje 1,2-dichlorethanem. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku a surový reakční produkt se použije do dalších reakcí bez dalšího čištění. Surový 2-brom-5-brommethyl-pyridin se rozpustí v chloroformu (100 ml) a k roztoku se přidá urotropin (70,0 mmol). Reakční směs se míchá za laboratorní teploty po dobu 16 hodin. Vyloučená sraženina se odsaje, promyje chloroformem a vysuší na vzduchu. Surová urotropinová sůl se zahřívá při teplotě 100 °C pod zpětným chladičem ve směsi konc.hydroxidu amonného (12 ml) a vody (80 ml) po dobu 90 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidá 40% roztok formaldehydu (5.0 ml) a vyloučená sraženina se zfiltruje, promyje ledovou vodou a vysuší v exsikátoru. Surový produkt se krystaluje z ethanolu. Výtěžek: 40 % t.t. 105 až 106°C. Elementární analýza: Vypočteno pro: C₆H₇BrN₂ (187,04): C, 38.53; H, 3.77; N, 14.98. Nalezeno: C, 38.22; H, 3.72; N, 14.71. HPLC-MS (ESI+): 188.02 (97.2%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 4.04(t, J=5.67, 2H, CH₂), 7.71(d, J=8.19, 1H, ArH), 7.95(dd, J=8.19, J'=1.95, 1H, ArH), 8.51(d, J=1.95, 1H, ArH), 8.74(s(br), 2H, NH₂).

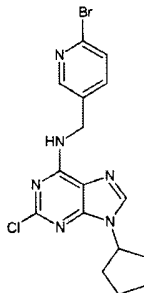
Příklad 1 Příprava (4-brom-benzyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-aminu



K suspenzi 9-cyklopentyl-2,6-dichlor-9H-purinu (7,78 mmol) ve směsi n-propanolu (40 ml) a N,N-diisopropyl-N-ethylaminu (23,34 mmol) se přidá 4-bromobenzylamin hydrochlorid (8,56 mmol) a suspenze se zahřívá v tlakové ampuli za stálého míchání pod argonem při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs odpaří za sníženého tlaku a k odparku se přidá voda (50 ml) a extrahuje se dvakrát dichlormethanem (50 ml). Spojené organické fáze se pro myjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Výtěžek: 98 % t.t.: 152 až 154 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₁₇H₁₇ClBrN₅ (406,71): C, 50.20; H, 4.21; N, 17.22. Nalezeno: C, 50.00; H, 3.99; N, 16.95. HPLC-MS (ESI+): 408 (99.9%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.64–1.69(m, 2H), 1.81–1.96(m, 4H),

2.09–2.15(m, 2H), 4.59(d, J=6.72, 2H, CH₂), 4.77(qui, J=7.05, 1H, CH), 7.28(d, J=8.22, 2H, ArH), 7.49(d, J=8.22, 2H, ArH), 8.26(s, 1H, CH), 8.83(t, J=6.72, 1H, NH)

5 **Příklad 2** Příprava (6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-aminu

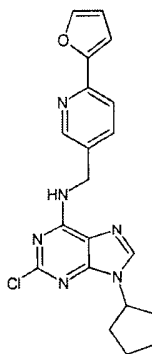


10 K suspenzi 9-cyklopentyl-2,6-dichlor-9H-purinu (13,6 mmol) ve směsi n-propanolu (60 ml) a *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (60,0 mmol) se přidá C-(6-bromo-pyridin-3-yl)methylamin (15,0 mmol). Suspenze se zahřívá v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se ponechá stát po dobu 12 hodin při teplotě 5 °C a poté se vyloučená bílá krystalická látka odsaje a promyje malým množstvím ledového isopropanolu. Surový produkt se vysuší při teplotě 80 °C po dobu 2 hodin. Výtěžek: 71 %, t.t.: 178 až 179 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₁₆H₁₆ClBrN₆ (407.70): C, 47.14; H, 3.96; N, 20.61. Nalezeno: C, 47.35; H, 3.88; N, 20.48. HPLC-MS (ESI⁺): 409 (98.5%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.64–1.69(m, 2H), 1.81–1.96(m, 4H), 2.09–2.15(m, 2H), 4.61(s(br), 2H, CH₂), 4.77(qui, J=7.20, 1H, CH), 7.59(d, J=8.19, 1H, ArH), 7.70(d, J=8.19, 1H, ArH), 8.26(s, 1H, CH), 8.38(s, 1H, ArH), 8.82(s(br), 1H, NH).

15

20

25 **Příklad 3** Příprava (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-2-yl-pyridin-3-yl-methyl)-aminu

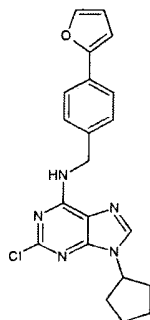


30 K suspenzi 9-cyklopentyl-2,6-dichloro-9H-purinu (4.70 mmol) ve směsi n-propanolu (15 ml) a *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (9,40 mmol) se přidá [6-(2-furyl)pyrid-3-yl]methamin (5 až 17 mmol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové ampuli po argonem při teplotě 120 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se odpaří za sníženého tlaku a k odparku se přidá voda (50 ml) a extrahuje se dvakrát dichloromethanem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Výtěžek: 96 %, t.t.: 119 až 122 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₀H₁₉ClN₆O (394.86): C, 60.84; H, 4.85; N, 21.28. Nalezeno: C, 60.56; H, 4.92; N, 21.48. HPLC-MS (ESI⁺): 396 (97.6%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.76–1.91(m, 6H), 2.22–2.28(m, 2H), 4.85–

35

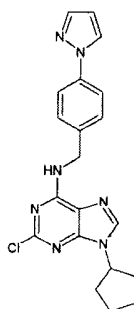
4.92(m, 3H, CH, CH₂), 6.54(d, J=3.42, 1H, ArH), 6.59(s(br), 1H, NH), 7.05(d, J=3.42, 1H, ArH), 7.53(d, J=3.42, 1H, ArH), 7.64–7.69(m, 2H, ArH), 7.75(d, J=6.27, 1H, ArH) 8.61(s, 1H, CH)

5 **Příklad 4** Příprava (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-furan-2-yl-benzyl)-aminu



10 K suspenzi 2-chlor-6-(4-brombenzylamino)-9-cyklopentyl-9H-purinu (2,46 mmol), 2-furylborité kyseliny (2,70 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (7,38 mmol) a tetrabutylammonium bromidu (0,05 mmol) v dimethylformamidu (10 ml) se přidá octan paladnatý (0,05 mmol). Reakční směs se zahřívá v tlakové ampuli za stálého míchání pod argonem při teplotě 120 °C po dobu 12 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs vlita do vody (100 ml) a vzniklá suspenze byla extrahována třikrát ethylacetátem (100 ml). Spojené organické fáze byly
15 promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl purifikován kolonovou chromatografií na silikagelu s použitím mobilní fáze o složení chloroform – methanol (19:1, v/v). Výtěžek: 55 %, t.t.: 135 až 137 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₁H₂₀ClN₅O (393.87): C, 64.04; H, 5.12; N, 17.78. Nalezeno: C, 64.25; H, 4.98; N, 17.67. HPLC-MS (ESI+): 394 (97.4%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.72–1.93(m, 6H), 2.22–2.28(m, 2H), 4.85–4.92(m, 3H, CH, CH₂), 6.65(d, J=3.33, 1H, ArH), 7.40(m, 2H, ArH), 7.48(t, J=3.33, 1H, ArH), 7.64–7.69(m, 3H, ArH, CH)
20

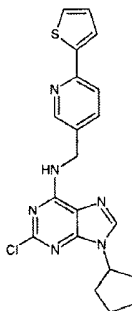
25 **Příklad 5** Příprava (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-aminu



9-Cyklopentyl-2,6-dichlor-9H-purin (4,70 mmol) byl rozpuštěn ve směsi n-propanolu (15,0 ml) a N,N-diisopropyl-N-ethylaminu (9,40 mmol) a k této směsi byl přidán 1-[4-(1Hpyrazol-1-yl)]fenylmethanamin (1,44 mmol). Reakční směs byla zahřívána za stálého míchání v tlakové ampuli při teplotě 100 °C po dobu 1,5 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla vyloučená bílá krystalická látka suspendována v ethanolu (20 ml), odsáta a promyta ledovým ethanolom (20 ml). Surový produkt byl vysušen při teplotě 80 °C po dobu 2 hodin krystalován z ethanolu. Výtěžek: 72 %, t.t.: 165 až 167 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₀H₁₉ClN₆O (394.86):
30 C, 60.84; H, 4.85; N, 21.28. Nalezeno: C, 60.56; H, 4.92; N, 21.48. HPLC-MS (ESI+): 394.3 (97.6%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.61–1.71(m, 2H), 1.80–1.98(m, 4H), 2.09–2.18(m, 2H), 4.66(d, J=5.25, 2H, CH₂), 4.77(qui, J=7.05, 1H, CH), 6.51(t, J=2.16, 1H, ArH), 7.45(d, J=8.37, 2H,
35

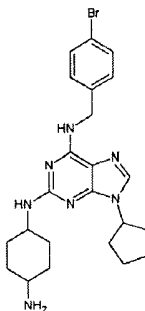
ArH), 7.71(d, J=2.16, 1H, ArH), 7.77(d, J=8.37, 2H, ArH), 8.27(s, 1H, CH), 8.43(d, J=2.16, 1H, ArH), 8.86(t, J=5.25, 1H, NH)

- 5 **Příklad 6** Příprava (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-yl-methyl)-aminu



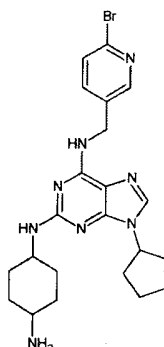
- 10 9-Cyklopentyl-2,6-dichlor-9H-purin (1,48 mmol) byl rozpuštěn ve směsi n-propanolu (15,0 ml) a N,N-diisopropyl-N-ethylaminu (6,0 mmol) a k tomuto roztoku byl přidán (6-thien-2-yl)pyrid-3-ylmethylamin dihydrochlorid (1,63 mmol). Reakční směs byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání pod argonem při teplotě 80 °C po dobu 16 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs zředěna vodou (30 ml) a vzniklá suspenze byla dvakrát extra-
 15 hována dichloromethanem (25 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl použit bez dalšího čištění. Výtěžek: 92 %, t.t.: 111 až 114 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₀H₁₉ClSN₆ (410,92): C, 58.46; H, 4.66; N, 20.45; S, 7.80. Nalezeno: C, 58.56; H, 4.72; N, 20.37, S, 7.55. HPLC-MS (ESI+): 411.3 (97.3%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.61–1.70(m, 2H),
 20 1.78–1.96(m, 4H), 2.09–2.16(m, 2H), 4.64(d, J=5.37, 2H, CH₂), 4.77(qui, J=7.20, 1H, CH), 7.14(t, J=4.52, 1H, ArH), 7.59(d, J=5.01, 1H, ArH), 7.74(d, J=5.01, 1H, ArH), 7.80(d, J=4.52, 1H, ArH), 7.85(d, J=4.52, 1H, ArH), 8.27(s, 1H, CH), 8.51(s, 1H, ArH), 8.87(t, J=5.37, 1H, NH)

- 25 **Příklad 7** Příprava N²-(4-amino-cyklohexyl)-N⁶-(4-bromo-benzyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin



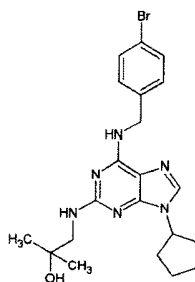
- 30 Směs (4-brom-benzyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9-purin-6-yl)-aminu (7,36 mmol) a trans-1,4-diaminocyklohexanu (110 mmol) se zahřívá v tlakové ampuli za stálého míchání pod argonem při teplotě 160 °C po dobu 12 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs suspenduje ve vodě (50 ml) a extrahuje se třikrát ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Su-
 35 rový produkt se krystaluje z ethanolu. Výtěžek: 91 %, t.t.: 123 až 124 °C. ¹H NMR (DMSO.d₆): 0.85–1.22(m, 4H), 1.64–2.04(m, 12H) 3.29–3.37(m, 3H, CH, NH₂), 3.52(sex, J=7.11, 1H, CH), 4.57(s(br), 2H, CH₂), 4.62(qui, 1H, J=7.38, CH), 6.02(d, J=7.89, 1H, NH), 7.28(d, J=8.31, 2H, ArH), 7.46(d, J=8.31, 2H, ArH), 7.73(s, 1H, CH), 7.84(s(br), 1H, NH).

Příklad 8 Příprava N²-(4-amino-cyklohexyl)-N⁶-(6-bromo-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin



Směs jemně rozetřeného (6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9-purin-6-yl)-aminu (7,36 mmol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (110,0 mmol) se zahřívá v tlakové ampuli za stálého míchání pod argonem při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na teplotu 100 °C se přidá voda (50 ml) a vzniklá suspenze se třikrát extrahuje ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v ethylacetátu (10 ml) a triturován diethyletherem, přičemž byla získána bílá krystalická látka, která byla odsáta a vysušena při 80 °C po dobu 4 hodin. Výtěžek: 33 %, t.t.: 114 až 116 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₂H₂₉BrN₈ (485.42): C, 54.43; H, 6.02; N, 23.08. Nalezeno: C, 54.29; H, 6.15; N, 23.00. HPLC-MS (ESI+): 487.3 (98.1%). ¹H NMR (CDCl₃): 1.13–1.29(m, 4H), 1.50(s(br), 2H, NH₂), 1.71–2.22(m, 12H), 2.75(sep, J=7.43, 1H, CH), 3.67(sex, J=7.52, 1H, CH), 4.59(d, J=7.52, 1H, NH), 4.70(qui, J=7.20, 1H, CH), 4.82(d, J=7.20, 2H, CH₂), 6.21(t, J=5.25, 1H, NH), 7.40(d, J=8.16, 1H, ArH), 7.55(dd, J=8.16, J'=2.4, 1H, ArH), 8.34(s, 1H, NH), 8.39(s, 1H, CH)

Příklad 9 Příprava 1-[6-(4-bromo-benzylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol

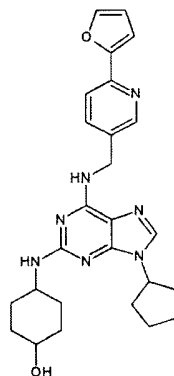


Směs (4-brom-benzyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-aminu (4,92 mmol), 1-amino-2-methylpropan-2-olu (25,0 mmol), *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (10,83 mmol) a *N*-methylpyrrolidonu (5,0 ml) se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě pod argonem při teplotě 160 °C po dobu 36 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs suspenduje ve vodě (25 ml) a dvakrát se extrahuje ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. K odparku se přidá 1 % vodný roztok kyselina chlorovodíkové (25 ml) a extrahuje se dvakrát dichlormethanem (25 ml). Spojené organické fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt byl použit bez dalšího čištění. Analytický vzorek byl získán kolonovou chromatografií na silikagelu s použitím mobilní fáze o složení chloroform-methanol 9:1, v/v. Výtěžek: 82 %, t.t.: 108 až 110 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro: C₂₁H₂₉BrN₆O (461.40): C, 54.67; H, 6.34; N, 18.21. Nalezeno: C, 54.59; H, 6.12; N, 18.07. HPLC-MS (ESI+): 482.3

(98.6%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.28(s, 6H, CH_3), 1.74–1.90(m, 6H), 2.05–2.38(m, 2H), 2.84(d, $J=2.32$, 2H, CH_2), 4.75–4.83(m, 3H, CH_2 , CH), 5.20(s(br), 1H, OH), 7.28(d, $J=7.75$, 2H, ArH), 7.45(d, $J=7.75$, 2H, ArH), 7.62(s, 1H, CH)

5

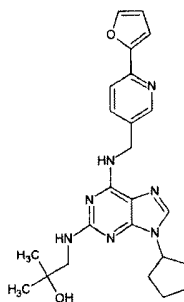
Příklad 10 Příprava 4-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-cyklohexanolu



10

trans-4-Aminocyklohexan-1-ol hydrochlorid (9,43 mmol) byl suspendován v methanolu (10 ml) a k této suspenzi byl přidán methoxid sodný (9,43 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 minut a poté zfiltrována. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a k odparku byl přidán (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-2-yl-pyridin-3-yl-methyl)-amin (0,5 mmol) a *N*-methylpyrrolidon (1 ml). Reakční směs byla zahřívána v tlakové ampuli za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 16 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla k reakční směsi přidána voda (10 ml) a byla extrahována dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl dále čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu s použitím mobilní fáze o složení chloroform-methanol (9:1). Výtěžek: 33 %, t.t.: 164 až 166 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_2$ (473.57): C, 65.94; H, 6.60; N, 20.70. Nalezeno: C, 66.08; H, 6.48; N, 20.34. HPLC-MS (ESI+): 474.4 (99.6%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.22(q, $J=10.2$, 2H), 1.43(q, $J=10.2$, 2H), 1.72–1.81(m, 2H), 1.90–2.02(m, 6H), 2.11–2.25(m, 4H), 2.86(s(br), 1H, OH), 3.61–3.76(m, 2H), 4.64(d, $J=7.68$, 1H, NH), 4.69(qui, $J=7.14$, 1H, CH), 4.79(d, $J=5.43$, 2H, CH_2), 6.12(t, $J=5.43$, 1H, NH), 6.52(dd, $J=3.39$, $J'=1.77$, 1H, ArH), 7.02(d, $J=3.39$, 1H, ArH), 7.48(s, 1H, ArH), 7.52(d, $J=3.39$, 1H, ArH), 7.63(d, $J=8.13$, 1H, ArH), 7.73(dd, $J=8.13$, $J'=2.07$, 1H, ArH), 8.61(s, 1H, CH)

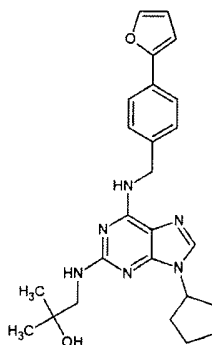
30 Příklad 11 Příprava 1-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-olu



35 Směs (2-chlor-9-cyklopentyl-9-purin-6-yl)-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-aminu (2,53 mmol), 1-amino-2-methylpropan-2-olu (12,66 mmol) a *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu (15,0 mmol) byla zahřívána za stálého míchání v tlakové ampuli pod argonem při teplotě 160 °C

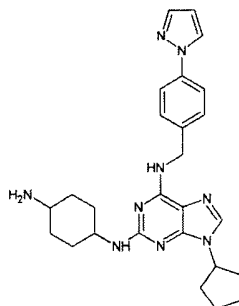
po dobu 16 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla tavenina rozpuštěna ve směsi ethylacetát (50 ml) a methanol (10 ml) a směs byla promyta vodou (50 ml). Vodná fáze byla poté ještě dvakrát extrahována ethylacetátem (40 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou, solankou, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny za sníženého tlaku. Surový produkt byl dále čištěn kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol (19:1, v/v). Výtěžek: 37 %, t.t.: 128 až 129 °C. Elementární analýza: vypočteno pro $C_{24}H_{29}N_7O_2$ (447.53): C, 64.41; H, 6.53; N, 21.91. Nalezeno: C, 64.65; H, 6.44; N, 21.58. HPLC–MS (ESI+): 448.4 (99.5%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.27(s, 6H, CH_3), 1.70–1.91(m, 6H), 2.20–2.35(m, 2H), 3.40(d, $J=6.21$, 2H, CH_2), 4.69(qui, $J=6.42$, 1H, CH), 4.79(s(br), 2H, CH_2), 5.24(t, $J=6.21$, 1H, NH), 5.61(s(br), 1H, OH), 6.04(s(br), 1H, NH), 6.54(t, $J=3.42$, 1H, ArH), 7.03(d, $J=3.42$, 1H, ArH), 7.50–7.54(m, 2H, ArH), 7.64(d, $J=8.25$, 1H, ArH), 7.74(dd, $J=8.25$, $J'=3.42$, 1H, ArH), 8.63(s, 1H, CH).

Příklad 12 Příprava 1-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-olu



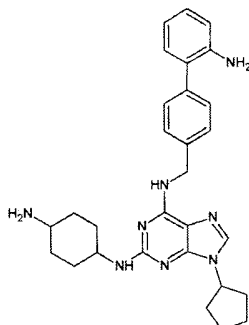
K suspenzi 1-[6-(4-brom-benzylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-olu (3,34 mmol), 2-furanylboritá kyselina (5,01 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (13,3 mmol) a tetrabutylammonium bromidu (0,067 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (15 ml) se přidá octan paladnatý (0,085 mmol). Reakční směs se zahřívá v tlakové ampuli pod argonem při teplotě 85 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (200 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (200 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu s použitím mobilní fáze chloroform – methanol (19:1, v/v). Výtěžek: 80 %, t.t.: 121 až 123 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{25}H_{30}N_6O_2$ (446.54): C, 67.24; H, 6.77; N, 18.82. Nalezeno: C, 67.59; H, 6.37; N, 18.62. HPLC–MS (ESI+): 447.4 (99.8%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.27(s, 6H, CH_3), 1.70–1.91(m, 6H), 2.20–2.35(m, 2H), 3.40(d, $J=6.18$, 2H, CH_2), 4.70(qui, $J=5.01$, 1H, CH), 4.79(s(br), 2H, CH_2), 5.29(s(br), 1H, OH), 5.62(t, $J=6.21$, 1H, NH), 7.21–7.63(m, 7H, ArH), 7.68(s(br), 1H, NH), 8.63(s, 1H, CH).

Příklad 13 Příprava N^2 -(4-Amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diaminu



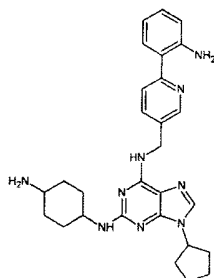
Směs dobře rozetřeného (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-aminu (0,63 mmol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (12,69 mmol) se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání pod argonem při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (50 ml) a extrahuje se dvakrát ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií za použití mobilní fáze chloroform – methanol (19:1, v/v). Výtěžek: 78 %, t.t.: 186 až 187 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₆H₃₃N₉ (471.60): C, 66.22.; H, 7.05; N, 26.73. Nalezeno: C, 66.48; H, 7.24; N, 16.51. HPLC-MS (ESI+): 472.4 (99.8%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.02–1.21(m, 4H), 1.64–1.2.05(m, 12H), 2.90–3.15(m, 3H, CH, NH₂), 3.59(sex, J=5.05, 1H, CH), 4.58–4.67(m, 3H, CH₂, CH), 6.05(d, J=7.29, 1H, NH), 6.51(t, J=2.28, 1H, ArH), 7.45(d, J=8.34, 2H, ArH), 7.70–7.86(m, 4H, ArH), 7.95(s(br), 1H, NH), 8.42(d, J=7.29, 1H, CH), 8.63(s, 1H, CH).

Příklad 14 Příprava N⁶-(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-N²-(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu



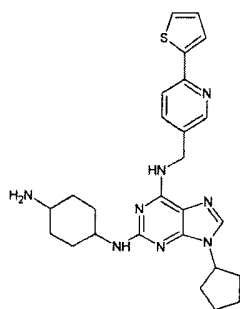
Směs N²-(4-amino-cyklohexyl)-N⁶-(4-brom-benzyl)-9-cyklopentyl-9-purin-2,6-diaminu (0,25 mmol), hydrochloridu 2-aminofenylborité kyseliny (0,75 mmol), trifenylfosfinu (0,50 mmol) a uhličitanu sodného (1,75 mmol) se suspenduje ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2.0 ml) a ke směsi se pod argonem přidá bis(dibenzylidenaceton)paladium (7,50 μmol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 80 °C po dobu 65 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 85 %, t.t.: 168 až 170 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro C₂₉H₃₆N₈ (496.65): C, 70.13.; H, 7.31; N, 22.56. Nalezeno: C, 70.32; H, 7.28; N, 22.46. HPLC-MS (ESI+): 497.4 (99.9%). ¹H NMR (DMSO-d₆): 1.14–1.26(m, 4H), 1.72–1.82(m, 2H), 1.83–1.96(m, 10H), 1.98–2.22(m, 4H), 2.71(sex, J=6.72, 1H, CH), 3.69–3.80(m, 3H, NH₂, CH), 4.66(d, J=7.71, 1H, NH), 4.74(qui, J=7.08, 1H, CH), 4.81(d, J=5.43, 2H, CH₂), 6.15(s(br), 1H, NH), 6.76(d, J=7.41, 1H, ArH), 6.82(t, J=7.41, 1H, ArH), 7.1 l(d, J=7.41, 1H, ArH), 7.15(t, J=7.41, 1H, ArH), 7.38–7.46(m, 5H, ArH, CH).

Příklad 15 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu



Směs N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (0,25 mmol), hydrochloridu 2-aminofenylborité kyseliny (0,75 mmol), trifenylfosfinu (0,50 mmol) a uhličitanu sodného (1,75 mmol) se suspenduje ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) a k této suspenzi se pod argonem přidá bis(dibenzylidenaceton)paládium (7,50 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě pod argonem při teplotě 120 °C po dobu 18 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (8:2:0.05). Výtěžek: 56 %, t.t.: 173 až 175 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{28}H_{35}N_9$ (497.64): C, 67.58; H, 7.09; N, 25.33. Nalezeno: C, 67.69; H, 7.19; N, 25.02. HPLC-MS (ESI+): 498.4 (99.9%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.14–1.34(m, 4H), 1.71–2.05(m, 12H), 2.10–2.23(m, 4H, 2xNH₂), 2.75(sep, J=7.32, 1H, CH), 3.73(sex, J=7.52, 1H, CH), 4.59(d, J=7.52, 1H, NH), 4.70(qui, J=7.20, 1H, CH), 4.82(d, J=7.20, 2H, CH₂), 5.92(t, J=7.20, 1H, NH), 6.75–6.8 l(m, 2H, ArH), 7.20(t, J=7.89, 1H, ArH), 7.47–.751(m, 2H, ArH), 7.6 l(d, J=8.34, 1H, ArH), 7.79(d, J=8.34, 1H, ArH), 8.63(s, 1H, CH)

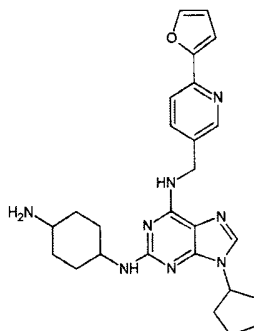
Příklad 16 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diaminu



Směs dobře rozetřeného (2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-aminu (0,75 mmol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (10,95 mmol) se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs suspenduje ve vodě (50 ml) a extrahuje se dvakrát ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 88 %, t.t.: 151 až 153 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{26}H_{34}N_8S$ (497.64): C, 63.64; H, 6.98; N, 22.84; S, 6.53. Nalezeno: C, 63.72; H, 7.08; N, 23.02; S, 6.28. HPLC-MS (ESI+): 489.4 (99.9%). 1H NMR ($DMSO-d_6$): 1.04–1.17(m, 4H), 1.64–2.05(m, 12H), 3.25–3.38(m, 3H, CH, NH₂), 3.54(sex, J=7.83, 1H, CH), 4.59–4.65(m, 3H, CH₂, CH), 6.09(d, J=7.83,

1H, NH), 7.13(t, J=4.05, 1H, ArH), 7.58(d, L=4.05, 1H, ArH), 7.71–7.84(m, 4H, ArH), 7.90(s(br), 1H, NH), 8.51(s, 1H, CH).

- 5 Příklad 17 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)–9 H-purin-2,6-diaminu



10 Metoda A

Směs jemně rozetřeného (2-chlor-9-cyklopentyl-9-purin-6-yl)–(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)–aminu (1,27 mmol) a *trans*-1,4-diaminocyklohexanu (19,05 mmol) se zahřívá za stálého míchání v tlakové ampuli pod argonem při teplotě 160 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou a (50 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform–methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 89 %, t.t.: 184 až 186 °C. Elementární analýza: vypočteno pro $C_{26}H_{32}N_8O$ (472.59): C, 66.08.; H, 6.83; N, 23.71. Nalezeno: C, 66.32; H, 6.59; N, 23.99. HPLC–MS (ESI+): 473.5 (98,6%)

Metoda B

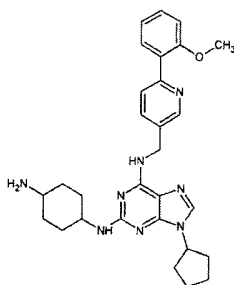
25 Směs N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)–9-cyklopentyl-9-purin-2,6-diaminu (0,41 mmol), 2-furanylborité kyseliny (1,24 mmol), trifenyfosfinu (0,25 mmol) a uhličitanu sodného (1.70 mmol) se suspenduje ve směsi 1,2-dimethoxyethan (3,0 ml) a voda (2,0 ml) a k této suspenzi se přidá bis(dibenzylideneaceton)paladium (12,0 μmol) pod argonem. Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové ampuli po argonem při teplotě 120 °C po dobu 6 hodin, po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (40 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (50 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0.05). Výtěžek: 78 %, t.t.: 184 až 186 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{26}H_{32}N_8O$ (472.59): C, 66.08.; H, 6.83; N, 23.71. Nalezeno: C, 66.25; H, 7.03; N, 23.54. HPLC–MS (ESI+): 473.5 (99.3%).

Metoda C

40 K suspenzi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)–9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (0,21 mmol), 2-furanylborité kyseliny (0,31 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (0,80 mmol) a tetrabutylamonium bromidu (0,003 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (5,0 ml) se přidá pod argonem octan paladnatý (2,5 μmol). Suspenze se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (20 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší bezvodým síranem sodným a odpaří

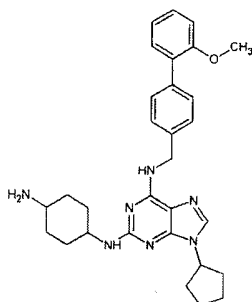
za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 81 %, t.t.: 180 až 183 °C. Elementární analýza: vypočteno pro $C_{26}H_{32}N_8O$ (472.59): C, 66.08.; H, 6.83; N, 23.71. Nalezeno: C, 66.18; H, 6.59; N, 23.88. HPLC–MS (ESI+): 473.5 (99.8%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.12–1.28(m, 4H), 1.71–2.15(m, 12H), 2.60–2.68(m, 3H, CH, NH_2), 3.68(sex, $J=10.02$, 1H, CH), 4.65–4.73(m, 4H, CH, CH_2 , NH), 6.50(t, $J=3.42$, 1H, ArH), 6.62(s(br), 1H, NH), 7.00(s, 1H, ArH), 7.41–7.69(m, 4H, ArH), 8.57(s, 1H, CH).

10 **Příklad 18** Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –[6-(2-methoxy-fenyl)–pyridin-3-ylmethyl]–9H-purin-2,6-diaminu



15 Směs N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)–9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (0,41 mmol), 2-methoxyfenylborité kyseliny (1,24 mmol), trifenyfosfinu (0,25 mmol) a uhličitanu sodného (1,70 mmol) se suspenduje ve směsi of 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) a k této suspenzi se přidá pod argonem bis(dibenzylidenaceton)paladium (12,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 120 °C po
20 dobu 3 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se dvakrát extrahuje ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 85 %, teplota tání 184 až 186 °C
25 Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{29}H_{36}N_8O$ (512.65): C, 67.94.; H, 7.08; N, 21.86. Nalezno: C, 67.78; H, 7.01; N, 21.59. HPLC–MS (ESI+): 513.5 (99.6%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.14–1.34(m, 4H), 1.71–2.22(m, 14H), 2.72(sep, $J=5.87$, 1H, CH), 3.75(sex, $J=6.25$, 1H, CH), 3.85(s, 3H, CH_3), 4.61(d, $J=5.87$, 1H, NH), 4.69(qui, $J=6.87$, 1H, CH), 4.82(d, $J=7.20$, 2H, CH_2), 6.00(s(br), $J=7.20$, 1H, NH), 7.00(d, $J=8.22$, 1H, ArH), 7.09(t, $J=7.32$, 1H, ArH),
30 7.35(t, $J=7.32$, 1H, ArH), 7.49(s, 1H, ArH), 7.70–7.74(m, 3H, ArH), 8.72(s, 1H, CH).

Příklad 19 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(2'-methoxy-bifenyl-4-yl-methyl)–9H-purin-2,6-diaminu

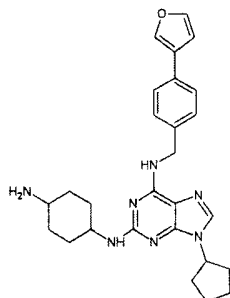


K suspenzi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(4-brom-benzyl)–9-cyklopentyl-9-purin-2,6-diaminu (0,25 mmol), 2-methoxyfenylborité kyseliny (0,38 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného

(1,00 mmol) a tetrabutylamonium bromidu (0,005 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (7,0 ml) se pod argonem přidá octan paladnatý (2,5 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 100 °C po dobu 20 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické

5 fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 88 %, t.t: 178 až 180 °C. Elementární analýza: vypočteno pro $C_{30}H_{37}N_7O$ (511.66): C, 70.42.; H, 7.29; N, 19.16. Nalezeno: C, 70.58; H, 7.10; N, 19.45. HPLC–MS (ESI+): 512.4 (99.8%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.14–1.34(m, 4H), 1.71–2.22(m, 14H), 2.74(sep, $J=6.33$, 1H, CH), 3.78(sex, $J=7.05$, 1H, CH), 4.00(s, 3H, CH_3), 4.59(d, $J=5.87$, 1H, NH), 4.71(qui, $J=6.87$, 1H, CH), 4.79(d, $J=7.20$, 2H, CH_2), 6.12(s(br), $J=7.42$, 1H, NH), 7.05(d, $J=8.05$, 1H, ArH), 7.09(t, $J=8.05$, 1H, ArH), 7.32(t, $J=8.05$, 1H, ArH), 7.49(d, $J=8.05$, 1H, ArH), 7.38–7.46(m, 4H, ArH), 8.65(s, 1H, CH).

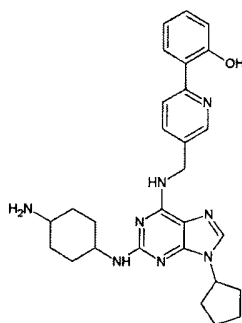
Příklad 20 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)–9H-purin-2,6-diaminu



K suspenzi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(4-brom-benzyl)–9-cyklopentyl–9-purin-2,6-diaminu (0,25 mmol), 3-furanylborité kyseliny (0,38 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (1,00 mmol) a tetrabutylamonium bromidu (0,005 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (7,0 ml) se pod argonem přidá octan paladnatý (2,5 μ mol). Reakční směs se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 100 °C po dobu 20 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické

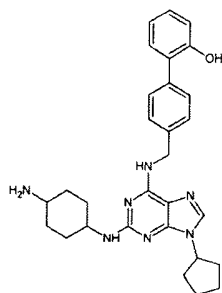
25 fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a opaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 94 %, teplota tání: 154 až 156 °C. Elementární analýza: vypočteno pro $C_{27}H_{33}N_7O$ (471.60): C, 68.76.; H, 7.05; N, 20.79. Nalezeno: C, 68.52; H, 7.16 N, 20.49. HPLC–MS (ESI+): 472.4 (97.8%). 1H NMR ($DMSO-d_6$): 1.04–1.17(m, 4H), 1.64–2.05(m, 12H), 3.15–3.19(m, 3H, CH, NH_2), 3.58(sex, $J=7.32$, 1H, CH), 4.58–4.63(m, 3H, CH, CH_2), 6.05(d, $J=7.32$, 1H, NH), 6.91(s, 1H, ArH), 7.34(d, $J=7.92$, 2H, ArH), 7.51(d, $J=7.92$, 2H, ArH), 7.70–7.73(m, 2H, ArH), 7.78(s(br), 1H, NH), 8.12(s, 1H, CH).

Příklad 21 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –[6-(2-hydroxy-fenyl)–pyridin-3-ylmethyl]–9H-purin-2,6-diaminu



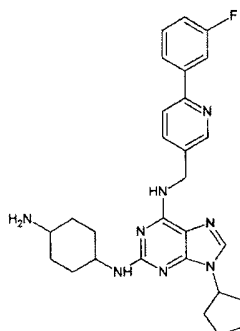
K roztoku N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-yl-methyl]-9H-purin-2,6-diaminu (0,48 mmol) v dichlormetanu (10 ml) se za stálého míchání za laboratorní teploty přikape roztok bromidu boritého (2,40 mmol) v dichloromethanu (10 ml). Reakční směs se dále míchá za laboratorní teploty po dobu 18 hodin a poté se po kapkách přidá methanol (5 ml). Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (4:1:0,05). Výtěžek: 86 %, t.t.: 202 až 203°C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{28}H_{34}N_8O$ (498.62): C, 67.45.; H, 6.87; N, 22.47. Nalezeno: C, 67.28; H, 7.11 N, 22.41. HPLC-MS (ESI+): 499.5 (97.8%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.16–1.40(m, 4H), 1.71–2.22(m, 12H), 2.49(s(br), 2H, NH_2), 2.80(sep, $J=5.31$, 1H, CH), 3.62(sex, $J=7.25$, 1H, CH), 4.61(d, $J=7.77$, 1H, NH), 4.69(qui, $J=7.17$, 1H, CH), 4.82(d, $J=5.43$, 2H, CH_2), 6.13(s(br), 1H, NH), 6.91(t, $J=7.38$, 1H, ArH), 7.02(d, $J=8.19$, 1H, ArH), 7.29(t, $J=7.38$, 1H, ArH), 7.50(s, 1H, ArH), 7.78(d, $J=8.19$, 1H, ArH), 7.82–7.86(m, 2H, ArH), 8.54(s, 1H, CH).

Příklad 22 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-hydroxy-bifenyl-4-yl-methyl)-9H-purin-2,6-diaminu



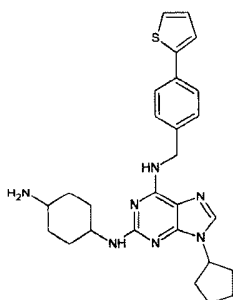
K roztoku N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9-purin-2,6-diaminu (0,48 mmol) v dichlormetanu (10 ml) se za stálého míchání za laboratorní teploty přikape roztok bromidu boritého (2,40 mmol) v dichloromethanu (10 ml). Reakční směs se dále míchá za laboratorní teploty po dobu 18 hodin a poté se po kapkách přidá methanol (5 ml). Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (4:1:0,05). Výtěžek: 95 %, teplota tání: 168 až 170 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{29}H_{35}N_7O$ (497.63): C, 69.99.; H, 7.09; N, 19.70. Nalezeno: C, 69.68; H, 7.23 N, 19.57. HPLC-MS (ESI+): 498.5 (99.9%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.16–1.40(m, 4H), 1.71–2.22(m, 12H), 2.52(s(br), 2H, NH_2), 2.76(sep, $J=5.43$, 1H, CH), 3.67(sex, $J=7.41$, 1H, CH), 4.59(d, $J=7.25$, 1H, NH), 4.72(qui, $J=7.00$, 1H, CH), 4.79(d, $J=5.63$, 2H, CH_2), 6.10(s(br), 1H, NH), 7.10(t, $J=7.43$, 1H, ArH), 7.16(d, $J=8.04$, 1H, ArH), 7.24(t, $J=7.43$, 1H, ArH), 7.48–7.66(m, 4H, ArH), 8.63(s, 1H, CH).

Příklad 23 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -[6-(3-fluoro-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diaminu



5 Ke směsi N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9-purin-2,6-diaminu (0,41 mmol), 3-fluorfenylborité kyseliny (1,24 mmol), trifenylfosfinu (0,25 mmol) a uhličitanu sodného (1,70 mmol) ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) se přidá pod argonem bis(dibenzylidenaceton)paladium (12,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá v
10 tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 18 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný
15 (9:1:0.05). Výtěžek: 92 %, teplota tání: 121 až 122 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{28}H_{33}FN_8O$ (500.61): C, 67.18.; H, 6.64; N, 22.38. Nalezeno: C, 67.41; H, 6.69; N, 22.09. HPLC-MS (ESI+): 501.4 (99.5%). 1H NMR ($CDCl_3$): 1.12–1.42(m, 4H), 1.71–2.21(m, 12H), 2.81(sex, J=5.87, 1H, CH), 3.12(s(br), 2H, NH_2), 3.73(sex, J=7.44, 1H, CH), 4.62–4.72(m, 2H, CH, NH), 4.81(d, J=5.77, 1H, CH_2), 6.33(t, J=5.77, 1H, NH), 7.12(t, J=8.25, 1H, ArH), 7.38–
20 7.44(m, 2H, ArH), 7.61–7.77(m, 4H, ArH), 8.72(s, 1H, CH)

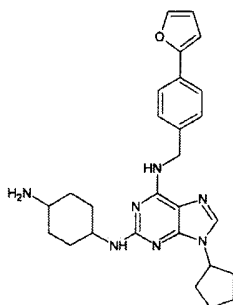
Příklad 24 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diaminu



25 Ke směsi N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -(4-brom-benzyl)-9-cyklopentyl-9-purin-2,6-diaminu (0,50 mmol), thiofen-2-borité kyseliny (1,50 mmol), trifenylfosfinu (0,5 mmol) a uhličitanu sodného (1,70 mmol) ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) se pod argonem
30 přidá bis(dibenzylidenaceton)paladium (15,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 48 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za
35 použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 71 %, teplota tání: 225 až 226 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{27}H_{33}N_7S$ (487.66): C, 66.50; H, 6.82; N, 20.11; S, 6.58. Nalezeno: C, 66.58; H, 6.51; N, 20.35; S, 6.41. HPLC-MS

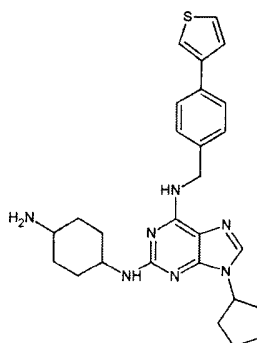
(ESI+): 488.5 (99.8%). ^1H NMR (CDCl_3): 1.20–1.28 (m, 4H), 1.61–2.22(m, 14H), 2.71(sep, $J=5.52$, 1H, CH), 3.72(sex, $J=7.44$, 1H, CH), 4.61(d, $J=7.44$, 1H, NH), 4.71(qui, $J=6.36$, 1H, CH), 4.78(d, $J=5.25$, 2H, CH_2), 5.93(s(br), 1H, NH), 7.08(t, $J=4.50$, 1H, ArH), 7.30(d, $J=4.50$, 1H, ArH), 7.38(d, $J=7.95$, 2H, ArH), 7.47(d, $J=4.50$, 1H, ArH), 7.57(d, $J=7.95$, 2H, ArH), 8.63(s, 1H, CH).

Příklad 25 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(4-furan-2-yl-benzyl)–9H-purin-2,6-diaminu



K suspenzi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(4-brom-benzyl)–9-cyklopentyl–9H-purin-2,6-diaminu (0,50 mmol), 2-furanylborité kyseliny (0,75 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (2,00 mmol) a tetrabutylamonium bromidu (0,01 mmol) v N,N -dimethylformamidu (10,0 ml) se pod argonem přidá octan paladnatý (2,5 μmol). Reakční směs se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 80 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 87 %, teplota tání: 157 až 159 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ (471.60): C, 68.76.; H, 7.05; N, 20.79. Nalezeno: C, 68.81; H, 7.22 N, 20.51. HPLC-MS (ESI+): 472.4 (99.8%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 1.04–1.17(m, 4H), 1.64–2.05(m, 12H), 2.65–2.72(m, 3H, CH, NH_2), 3.58(sex, $J=7.55$, 1H, CH), 4.58–4.63(m, 3H, CH, CH_2), 6.04(d, $J=7.55$, 1H, NH), 7.28(d, $J=7.89$, 2H, ArH), 7.38(d, $J=5.95$, 1H, ArH), 7.46(d, $J=7.89$, 2H, ArH), 7.61(d, $J=5.95$, 1H, ArH), 7.70–7.73(m, 2H, ArH, NH), 7.95(s, 1H, CH).

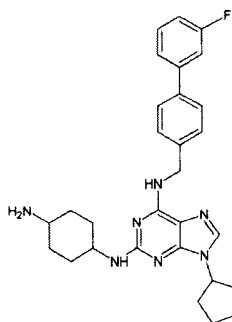
Příklad 26 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)–9H-purin-2',6-diaminu



Ke směsi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(4-brom-benzyl)–9-cyklopentyl–9H-purin-2,6-diaminu (0,50 mmol), thiofen-3-borité kyseliny (1,50 mmol), trifenylfosfinu (0,25 mmol) a uhličitanu sodného (2,0 mmol) ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) se přidá pod argo-

nem bis(dibenzylidenaceton)paladium (15,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá v tlakové tubě za stálého míchání při teplotě 120 °C po dobu 48 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří se za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,5). Výtěžek: 71 %, teplota tání: 114 až 118 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{27}H_{33}N_7S$ (487.66): C, 66.50.; H, 6.82; N, 20.11; S, 6.58. Nalezeno: C, 66.49; H, 7.06 N, 20.39; S, 6.32. HPLC–MS (ESI+): 488.4 (99.9%). 1H NMR (DMSO– d_6): 1.07–1.22(m, 4H), 1.64–2.04(m, 12H), 2.62–2.75(m, 3H, CH, NH_2), 3.58(sex, $J=7.25$, 1H, CH), 4.60–4.65(m, 3H, CH, CH_2), 6.02(d, $J=7.20$, 1H, NH), 7.37(d, $J=7.71$, 2H, ArH), 7.50(d, $J=4.83$, 1H, ArH), 7.61(d, $J=7.71$, 2H, ArH), 7.72–7.78(m, 3H, ArH, NH), 8.32(s, 1H, CH).

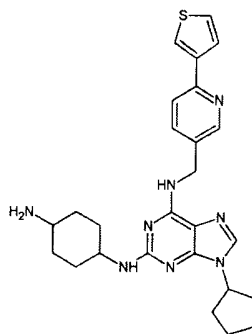
15 **Příklad 27** Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(3'-fluor-bifenyl-4-yl-methyl)–9H-purin-2,6-diaminu



20 Ke směsi N^2 –(4-amino-cyklohexyl)– N^6 –(4-brom-benzyl)–9-cyklopentyl–9-purin-2,6-diaminu (0,50 mmol), 3-fluorfenylborité kyseliny (1,50 mmol), trifenylfosfinu (0,25 mmol) a uhličitanu sodného (2,0 mmol) ve směsi of 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) se přidá pod argonem bis(dibenzylidenaceton)paladium (15,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 120 °C po dobu 65 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 75 %, t.t.: 146 až 148 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{29}H_{34}FN_7$ (499.63): C, 69.71.; H, 6.86; N, 19.62. Nalezen: C, 69.95; H, 7.12; N, 19.45. HPLC–MS (ESI+): 500.4 (99.9%). 1H NMR (DMSO– d_6): 1.02–1.21(m, 4H), 1.61–2.06(m, 12H), 2.65–2.72(m, 3H, CH, NH_2), 3.59(sex, $J=7.19$, 1H, CH), 4.60–4.66(m, 3H, CH_2 , CH), 6.01(d, $J=6.60$, 1H, NH), 7.12–7.18(m, 1H, ArH), 7.42–7.48(m, 5H, ArH), 7.61(d, $J=8.01$, 2H, ArH), 7.73(s, 1H, CH), 7.86(s(br), 1H, NH).

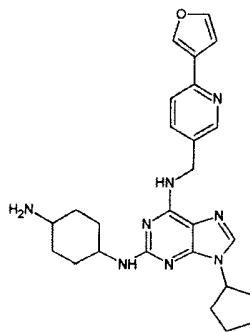
35

Příklad 28 Příprava N^2 –(4-amino-cyklohexyl)–9-cyklopentyl– N^6 –(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)–9H-purin-2,6-diaminu



Ke směsi N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (0,41 mmol), 3-thienylborité kyseliny (1,24 mmol), trifenylfosfinu (0,25 mmol) a uhlíčitanu sodného (1,70 mmol) ve směsi 1,2-dimethoxyethanu (3,0 ml) a vody (2,0 ml) se pod argonem přidá bis(dibenzylidenaceton)paladium (12,0 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 120 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 68 %, t.t.: 139 až 140 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{26}H_{34}N_8S$ (497.64): C, 63.64; H, 6.98; N, 22.84; S, 6.53. Nalezeno: C, 63.62; H, 6.78; N, 22.59; S, 6.76. HPLC-MS (ESI+): 498.4 (98.9%). 1H NMR (DMSO- d_6): 1.04–1.17(m, 4H), 1.64–2.05(m, 12H), 3.25–3.38(m, 3H, CH, NH_2), 3.54(sex, $J=7.56$, 1H, CH), 4.59–4.65(m, 3H, CH_2 , CH), 6.09(d, $J=7.56$, 1H, NH), 7.1 l(s, $J=4.12$, 1H, ArH), 7.62(d, $J=4.05$, 1H, ArH), 7.72–7.82(m, 4H, ArH), 7.90(s(br), 1H, NH), 8.53(s, 1H, CH).

Příklad 29 Příprava N^2 -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl- N^6 -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diaminu



K suspenzi N^2 -(4-amino-cyklohexyl)- N^6 -(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diaminu (0,21 mmol), 3-furanylborité kyseliny (0,31 mmol), trihydrátu fosforečnanu draselného (0,80 mmol) a tetrabutylamonium bromidu (0,003 mmol) v N,N -dimethylformamidu (5,0 ml) se pod argonem přidá octan paladnatý (2,5 μ mol). Reakční směs se zahřívá za stálého míchání v tlakové tubě při teplotě 120 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs zředí vodou (25 ml) a vzniklá suspenze se extrahuje dvakrát ethylacetátem (25 ml). Spojené organické fáze se promyjí vodou, solankou, vysuší se bezvodým síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se dále čistí kolonovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze o složení chloroform – methanol – konc.hydroxid amonný (9:1:0,05). Výtěžek: 56 %, t.t.: 165 až 167 °C. Elementární analýza: Vypočteno pro $C_{26}H_{32}N_8O$ (472.59): C, 66.08; H, 6.83; N, 23.71. Nalezeno: C, 66.01; H, 6.93; N, 23.51. HPLC-MS (ESI+): 473.26 (98.6%). 1H NMR (CDCl $_3$): 1.12–1.28(m, 4H), 1.71–2.15(m, 12H), 2.60–2.68(m, 3H, CH, NH_2), 3.68(sex, $J=10.00$, 1H, CH), 4.65–4.73(m, 4H, CH, CH_2 , NH), 6.50(t, $J=3.42$, 1H, ArH), 6.62(s(br), 1H, NH), 6.91(s, 1H, ArH), 7.00(s, 1H, ArH), 7.61–7.73(m, 4H, ArH), 8.57(s, 1H, CH).

Tabulka 1: Látky připravené podle příkladů

Č.	SYSTEMATICKÝ NÁZEV SLOUČENINY	ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA	MS (ZMD)	
			[M-H] ^{a)}	[M+H] ^{b)}
		Vypočteno/Nalezeno [%]		
BP1	4-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-cyklohexanol	C, 68.62/68.50; H, 6.83/6.60; N, 17.78/17.25	471.60	473.55
BP2	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.50/66.82; H, 6.82/6.64; N, 20.11/20.32; S 6.58/6.42	486.66	488.58
BP3	4'-{[2-(4-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina	C, 68.55/68.47; H, 6.71/6.42; N, 18.65/18.49	524.53	526.70
BP4	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 68.76/68.52; H, 7.05/6.91; N, 20.79/20.49	470.58	472.60
BP5	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.50/66.41; H, 6.82/6.95; N, 20.11/19.88; S 6.58/6.62	486.66	488.58
BP7	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.50/66.41; H, 6.82/6.95; N, 20.11/19.88; S 6.58/6.62	486.66	488.58
BP8	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-N ⁶ -[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.06/67.39; H, 6.88/6.95; N, 26.07/26.29	482.65	484.56
BP9	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 63.54/63.21; H, 6.82/6.55; N, 29.64/29.50	471.59	473.42
BP10	4-(5-{[2-(4-amino-cyklohexylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina	C, 66.14/66.15; H, 6.51/6.32; N, 21.28/21.03	525.58	527.78
BP11	N ² -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.50/66.35; H, 6.82/6.59; N, 20.11/19.75; S 6.58/6.41	486.66	488.58
BP12	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.71/69.52; H 6.86/6.48; N, 19.62/19.32	498.58	500.64
BP13	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-furan-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 68.76/68.68; H, 7.05/7.32; N, 20.79/20.68	470.58	472.60
BP14	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.08/66.29; H, 6.83/6.74; N, 23.71/23.55	471.63	473.68
BP15	N ² -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.94/67.62; H, 7.08/6.86; N, 21.86/21.41	511.65	513.78
BP16	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 70.42/70.56; H, 7.29/7.01; N, 19.16/19.56	510.69	512.72
BP17	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.99/69.72; H, 7.09/7.12; N, 19.70/19.54	496.65	498.92
BP18	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.94/67.82; H, 7.08/7.36; N, 21.86/21.55	511.68	513.74
BP19	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.18/66.94; H, 6.64/6.35; N, 22.38/22.65	499.69	501.65
BP20	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.45/67.21; H, 6.87/6.53; N, 22.47/22.41	497.62	499.58
BP21	4-[9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino]-cyklohexanol	C, 65.94/65.95; H, 6.60/6.47; N, 20.70/20.50	472.55	474.60
BP22	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.58/67.96; H, 7.09/7.00; N, 25.33/25.12	496.50	498.55
BP23	(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-amin	C, 60.84/60.66; H, 4.92/4.68; N, 21.48/21.19	392.28	394.30
BP24	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-pyrazol-1-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.22/66.49; H, 7.05/7.28; N, 26.73/26.46	470.55	472.63
BP25	N ² -(2-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.45/67.33; H, 6.87/6.83; N, 22.47/22.39	497.60	499.54
BP26	N ² -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.50/66.67; H, 6.82/6.99; N, 20.11/20.38; S 6.58/6.69	486.60	488.60
BP27	N ² -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.94/67.81; H, 7.08/7.09; N, 21.86/21.55	511.70	513.80
BP28	N ² -(3-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-hydroxy-	C, 67.45/67.33; H, 6.87/6.83;	497.60	499.54

	fenyl]-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	N, 22.47/22.39		
BP29	(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 58.46/58.49; H, 4.66/4.39; N, 20.45/20.26	409.85	411.96
BP30	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 63.91/63.72; H, 6.60/6.51; N, 22.93/22.71; S, 6.56/6.24	487.62	489.72
BP31	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.68/69.25; H, 7.10/6.82; N, 23.22/23.02	481.58	483.75
BP32	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 70.13/69.95; H, 7.31/7.15; N, 22.56/22.46	495.58	497.82
BP33	4-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol	C, 67.81/67.49; H, 6.87/6.55; N, 19.09/19.27	512.57	514.80
BP34	4-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino)-cyklohexanol	C, 67.31/67.15; H, 6.66/6.47; N, 19.62/19.53	498.52	500.57
BP35	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 63.91/64.12; H, 6.60/6.91; N, 22.93/22.68; S, 6.56/6.35	487.62	489.72
BP36	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.08/65.92; H, 6.83/6.59; N, 23.71/23.41	471.55	473.65
BP37	2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethanol	C, 66.51/66.55; H, 6.82/6.69; N, 20.11/20.01	486.60	488.57
BP38	2-(2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethoxy)-ethanol	C, 65.52/65.38; H, 7.01/6.93; N, 18.44/18.03	530.66	532.63
BP39	(9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-amin	C, 69.06/69.21; H, 6.65/6.28; N, 20.88/20.62	468.55	470.60
BP40	(9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 64.70/64.25; H, 6.11/5.85; N, 22.01/22.25	444.50	446.65
BP41	(9-cyklopentyl-2-morfolin-4-yl-9H-purin-6-yl)-[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin	C, 65.94/65.74; H, 5.96/5.82; N, 20.70/20.55	472.55	474.62
BP42	1-(9-cyklopentyl-6-{{[3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol	C, 68.33/68.59; H, 6.58/6.52; N, 17.71/17.52	473.51	475.62
BP43	1-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol	C, 65.67/65.42; H, 6.36/6.16; N, 20.62/20.48	474.52	476.68
BP44	1-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol	C, 66.51/66.37; H, 6.82/6.41; N, 20.11/19.94	486.59	488.62
BP45	1-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol	C, 65.94/65.68; H, 6.60/6.65; N, 20.70/20.54	472.55	474.60
BP46	4-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-butan-2-ol	C, 67.80/67.53; H, 7.00/6.56; N, 18.25/18.00	459.55	461.62
BP47	4-{9-cyklopentyl-6-{{[6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol	C, 65.06/65.21; H, 6.77/6.51; N, 21.24/21.11	460.51	462.62
BP48	4-(9-cyklopentyl-6-{{[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-butan-2-ol	C, 66.64/66.58; H, 7.04/7.25; N, 23.03/22.86	485.59	487.63
BP49	N ² -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 61.58/61.28; H, 6.29/6.05; N, 24.98/24.78	447.62	449.63
BP50	N ² -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.08/66.29; H, 6.83/6.59; N, 23.71/23.56	471.55	473.63
BP51	N ² -(2-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-9H-purin-2,6-diamin	C, 65.48/65.49; H, 6.59/6.47; N, 24.44/24.11	457.42	459.45
BP52	N ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 64.40/64.10; H, 6.53/6.32; N, 21.91/22.07; S, 7.16/6.95	446.59	448.64
BP53	N ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(4-furan-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.80/66.59; H, 6.77/6.51; N, 22.72/22.48	430.56	432.58
BP54	N ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl-N ⁶ -(3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 67.95/67.88; H, 6.58/6.56; N, 21.33/21.01	458.50	460.40

BP55	<i>N</i> ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 68.76/68.98%; H, 7.05/7.00; N, 20.79/20.96	470.60	472.63
BP56	<i>N</i> ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 68.25/68.00; H, 6.83/6.57; N, 21.43/21.15	456.57	458.60
BP57	<i>N</i> ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 63.87/63.65; H, 6.53/6.54; N, 25.91/25.76	431.50	433.58
BP58	<i>N</i> ² -(3-amino-propyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 65.20/65.03; H, 6.35/6.08; N, 24.33/24.59		
BP60	<i>N</i> ² -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(4-thiofen-3-yl-benzyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 63.71/63.52; H, 6.28/6.54; N, 22.61/22.35; S, 7.40/7.20	432.57	434.57
BP61	<i>N</i> ² -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(2'-amino-bifenyl-4-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 67.85/67.58; H, 6.83/6.59; N, 25.32/25.00	441.60	443.58
BP62	<i>N</i> ² -(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl- <i>N</i> ⁶ -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9 <i>H</i> -purin-2,6-diamin	C, 60.81/60.62; H, 6.03/5.89; N, 25.79/25.51; S, 7.38/7.02	433.55	435.57
BP63	4-(5-{[2-(2-amino-ethyl)-9-cyklopentyl-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino]-methyl}-pyridin-2-yl)-benzoová kyselina	C, 63.54/63.82; H, 5.97/6.12; N, 23.71/23.46	471.56	473.60
BP65	3-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino]-propan-1-ol	C, 64.26/64.58; H, 6.29/6.15; N, 18.73/18.54; S, 7.15/7.00	447.64	449.58
BP66	3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino]-propan-1-ol	C, 66.65/66.81; H, 6.53/6.74; N, 19.43/19.01	431.50	433.54
BP67	3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-propan-1-ol	C, 68.62/68.98; H, 6.83/6.56; N, 17.78/17.54	471.58	473.60
BP68	3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-propan-1-ol	C, 68.10/67.82; H, 6.59/6.47; N, 18.33/18.01	457.56	459.55
BP69	4'-{[9-cyklopentyl-2-(3-hydroxy-propylamino)-9 <i>H</i> -purin-6-ylamino]-methyl}-bifenyl-4-karboxylová kyselina	C, 66.65/66.41; H, 6.21/6.20; N, 17.27/17.05	485.58	487.58
BP70	3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-propan-1-ol	C, 61.45/61.59; H, 6.05/5.89; N, 21.81/21.54; S, 7.13/7.00	448.60	450.55
BP71	3-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-propan-1-ol	C, 63.72/63.98; H, 6.28/5.96; N, 22.62/22.45	432.51	434.55
BP72	3-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-propan-1-ol	C, 63.72/63.58; H, 6.28/6.53; N, 22.62/22.81	432.51	434.55
BP73	3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino)-propan-1-ol	C, 65.94/65.74; H, 6.60/6.41; N, 20.70/20.46	472.57	474.58
BP74	3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino)-propan-1-ol	C, 65.34/65.02; H, 6.36/6.54; N, 21.34/21.08	458.56	460.58
BP76	(<i>R</i>)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino]-pentan-2-ol	C, 67.80/68.11; H, 7.00/7.05; N, 18.25/17.94	459.65	461.67
BP77	(<i>R</i>)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino]-pentan-2-ol	C, 67.80/67.59; H, 7.00/6.81; N, 18.25/18.26	459.67	461.69
BP78	(<i>R</i>)-3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-pentan-2-ol	C, 69.57/69.42; H, 7.25/7.00; N, 16.79/17.03	499.62	501.62
BP79	(<i>R</i>)-3-{9-cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-pentan-2-ol	C, 69.11/69.42; H, 7.04/6.84; N, 17.27/17.00	485.61	487.65
BP80	(<i>R</i>)-3-[9-cyklopentyl-6-(4-pyrazol-1-yl-benzylamino)-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino]-pentan-2-ol	C, 65.19/65.00; H, 7.00/6.75; N, 24.33/24.00	459.55	461.57
BP81	(<i>R</i>)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-pentan-2-ol	C, 62.87/62.58; H, 6.54/6.55; N, 20.53/20.48; S, 6.71/6.57	476.60	478.64
BP82	(<i>R</i>)-3-{9-cyklopentyl-6-[(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino}-pentan-2-ol	C, 62.87/62.88; H, 6.54/6.32; N, 20.53/20.57; S, 6.71/6.74	476.60	478.64
BP83	(<i>R</i>)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino)-pentan-2-ol	C, 66.24/66.58; H, 6.59/6.64; N, 20.03/19.86	488.63	490.65
BP84	(<i>R</i>)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino)-pentan-2-ol	C, 67.04/67.10; H, 7.03/7.25; N, 19.55/19.19	500.65	502.66
BP85	(<i>R</i>)-3-(9-cyklopentyl-6-{[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino}-9 <i>H</i> -purin-2-ylamino)-pentan-2-ol	C, 66.51/66.83; H, 6.82/6.94; N, 20.11/20.03	486.60	488.62
BP87	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9 <i>H</i> -purin-6-	C, 69.20/69.51; H, 6.88/6.52;	467.52	469.62

	yl)-(4-pyridin-2-yl-benzyl)-amin	N, 23.91/23.87		
BP88	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl)-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-amin	C, 65.93/65.78; H, 6.60/6.52; N, 20.70/20.41; S, 6.77/6.52	472.65	474.66
BP89	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl)-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-amin	C, 65.93/66.06; H, 6.60/6.74; N, 20.70/20.35; S, 6.77/6.92	472.65	474.66
BP90	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl)-(4-furan-2-yl-benzyl)-amin	C, 68.25/68.00; H, 6.83/6.56; N, 21.43/21.11	456.55	458.62
BP91	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl)-(4-furan-3-yl-benzyl)-amin	C, 68.25/68.52 H, 6.83/6.99; N, 21.43/21.34	456.55	458.62
BP92	[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-amin	C, 66.50/66.38; H, 6.65/6.47; N, 26.85/26.96	468.58	470.62
BP93	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 63.26/63.59; H, 6.37/6.02; N, 23.61/23.96; S, 6.76/6.52	473.63	475.65
BP94	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 63.26/62.95; H, 6.37/6.56; N, 23.61/23.33; S, 6.76/6.48	473.63	475.65
BP95	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 65.48/65.19; H, 6.59/6.28; N, 24.44/24.16	457.63	459.57
BP96	[9-cyklopentyl-2-(4-methyl-piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 65.48/65.59; H, 6.59/6.74; N, 24.44/24.21	457.63	459.57
BP97	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-2-yl-benzyl)-amin	C, 65.33/65.22; H, 6.36/6.08; N, 21.33/20.96; S, 6.98/6.69	458.59	460.63
BP98	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-thiofen-3-yl-benzyl)-amin	C, 65.33/65.54; H, 6.36/6.59; N, 21.33/21.59; S, 6.98/7.05	458.59	460.63
BP99	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-2-yl-benzyl)-amin	C, 67.70/67.55; H, 6.59/6.47; N, 22.11/22.02	442.56	444.56
BP100	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(4-furan-3-yl-benzyl)-amin	C, 67.70/67.82; H, 6.59/6.68; N, 22.11/21.84	442.56	444.56
BP101	(4-brom-benzyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-amin	C, 50.20/49.96; H, 4.21/4.63; N, 17.22/17.02	405.58	407.73
BP102	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-N ⁶ -(4-brom-benzyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin	C, 57.02/56.85; H, 6.24/6.43; N, 20.24/20.00	483.42	485.50
BP103	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl)-amin	C, 68.77/68.52; H, 6.41/6.78; N, 20.79/20.48	470.55	472.55
BP104	[2,2']bipyridinyl-5-ylmethyl-[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-amin	C, 65.91/65.77; H, 6.42/6.56; N, 27.67/27.54	454.56	456.54
BP105	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 61.72/61.55; H, 6.08/5.87; N, 25.04/25.55; S, 7.16/6.96	459.58	461.58
BP106	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 61.72/61.84; H, 6.08/6.12; N, 25.04/25.05; S, 7.16/7.28	459.58	461.58
BP107	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 64.84/64.51; H, 6.35/6.12; N, 25.21/25.56	443.55	445.62
BP108	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 64.84/64.55; H, 6.35/6.52; N, 25.21/24.94	443.55	445.58
BP109	(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-amin	C, 47.14/47.28; H, 3.96/3.67; N, 20.61/20.19	406.70	408.82
BP110	N ² -(4-amino-cyklohexyl)-N ⁶ -(6-brom-pyridin-3-ylmethyl)-9-cyklopentyl-9H-purin-2,6-diamin	C, 54.43/54.62; H, 6.02/5.87; N, 23.08/23.19	484.42	486.39
BP111	[9-cyklopentyl-2-(piperazin-1-yl)-9H-purin-6-yl]-[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amin	C, 66.50/66.24; H, 6.65/6.68; N, 26.85/26.57	468.56	470.54
BP112	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(4-pyridin-2-yl-benzyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.68/69.54; H, 7.10/6.89; N, 23.22/22.95	481.60	483.58
BP113	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.71/69.52; H, 6.86/6.41; N, 19.62/19.47	498.61	500.65
BP114	1-[6-(4-brom-benzylamino)-9-cyklopentyl-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol	C, 54.67/54.59; H, 6.34/6.12; N, 18.21/18.07	460.40	462.38
BP115	1-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2-methyl-propan-2-ol	C, 67.24/67.59; H, 6.77/6.37; N, 18.82/18.62	445.40	447.38

BP116	(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amin	C, 60.84/60.61; H, 4.85/4.87; N, 21.28/21.11	393.85	395.92
BP117	1-{9-cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino}-2-methyl-propan-2-ol	C, 64.41/64.65; H, 6.53/6.44; N, 21.91/21.58	446.58	448.60
BP118	(2-chlor-9-cyklopentyl-9H-purin-6-yl)-(4-furan-2-yl-benzyl)-amin	C, 64.04/64.12; H, 5.12/5.36; N, 17.78/17.49	392.91	393.88
BP119	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 70.42/70.12; H, 7.29/6.96; N, 19.16/19.28	510.64	512.66
BP120	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 69.99/69.74; H, 7.09/6.88; N, 19.70/19.55	496.66	498.61
BP122	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 63.91/63.78; H, 6.60/6.65; N, 22.93/22.84; S, 6.56/6.41	487.63	489.67
BP123	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(6-thiofen-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 63.91/63.51; H, 6.60/6.39; N, 22.93/22.67; S, 6.56/6.62	487.64	489.66
BP124	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.08/66.12; H, 6.83/6.92; N, 23.71/23.54	471.59	473.61
BP125	9-cyklopentyl-N ² -piperidin-4-ylmethyl-N ⁶ -(6-furan-3-yl-pyridin-3-ylmethyl)-9H-purin-2,6-diamin	C, 66.08/66.02; H, 6.83/6.59; N, 23.71/23.47	471.59	473.61
BP127	(R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol	C, 64.91/64.68; H, 6.54/6.32; N, 18.17/17.89; S, 6.93/6.84	461.61	463.62
BP128	(R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol	C, 64.91/65.02; H, 6.54/6.63; N, 18.17/18.19; S, 6.93/6.54	461.61	463.62
BP129	(R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol	C, 67.24/67.12; H, 6.77/6.72; N, 18.82/18.63	445.56	447.58
BP130	(R)-2-[9-cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-butan-1-ol	C, 67.24/67.52; H, 6.77/6.61; N, 18.82/18.46	445.55	447.57
BP131	(R)-2-(9-cyklopentyl-6-[[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol	C, 65.67/65.52; H, 6.36/6.12; N, 20.62/20.14	474.56	476.60
BP132	(R)-2-(9-cyklopentyl-6-[[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol	C, 66.51/66.28; H, 6.82/6.49; N, 20.11/20.01	486.60	488.58
BP133	(R)-2-(9-cyklopentyl-6-[[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-ylamino)-butan-1-ol	C, 65.94/65.81; H, 6.60/6.49; N, 20.70/20.51	472.57	474.59
BP135	2-[4-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl]-ethanol	C, 66.51/66.85; H, 6.82/6.56; N, 20.11/19.86	486.60	488.58
BP136	2-(4-{9-Cyklopentyl-6-[(3'-fluor-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethanol	C, 67.55/67.23; H, 6.65/6.42; N, 19.02/19.25	514.63	516.62
BP137	2-(4-{9-Cyklopentyl-6-[(2'-methoxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethanol	C, 68.29/68.52; H, 7.07/6.86; N, 18.58/18.31	526.68	528.70
BP138	2-(4-{9-Cyklopentyl-6-[(2'-hydroxy-bifenyl-4-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethanol	C, 67.81/67.98; H, 6.87/6.45; N, 19.09/19.25	512.65	514.60
BP139	4'-({9-Cyklopentyl-2-[4-(2-hydroxy-ethyl)-piperazin-1-yl]-9H-purin-6-ylamino}-methyl)-bifenyl-4-karboxylová kyselina	C, 66.52/66.41; H, 6.51/6.32; N, 18.10/17.85	540.66	542.60
BP140	2-(4-{6-[[2,2']Bipyridinyl-5-ylmethyl]-amino}-9-cyklopentyl-9H-purin-2-yl)-piperazin-1-yl)-ethanol	C, 64.91/64.62; H, 6.66/6.62; N, 25.23/24.96	498.61	500.58
BP141	2-[4-(9-Cyklopentyl-6-[[6-(3-fluor-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-yl)-piperazin-1-yl]-ethanol	C, 65.10/64.87; H, 6.44/6.11; N, 21.69/21.48	515.63	517.59
BP142	2-[4-(9-Cyklopentyl-6-[[6-(2-methoxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-yl)-piperazin-1-yl]-ethanol	C, 65.89/65.51; H, 6.86/6.47; N, 21.20/21.00	527.63	529.65
BP143	2-[4-(9-Cyklopentyl-6-[[6-(2-hydroxy-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-yl)-piperazin-1-yl]-ethanol	C, 65.35/65.02; H, 6.66/6.64; N, 21.77/21.54	513.62	515.60
BP145	2-(2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethoxy)-ethanol	C, 63.59/63.19; H, 6.81/6.69; N, 17.90/17.85; S, 5.85/5.63	546.71	548.68
BP146	2-(2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-thiofen-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethoxy)-ethanol	C, 63.59/63.75; H, 6.81/6.52; N, 17.90/17.68; S, 5.85/5.92	546.71	548.67
BP147	2-(2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethoxy)-ethanol	C, 65.52/65.71; H, 7.01/6.83; N, 18.44/18.16	530.65	532.66

BP148	2-(2-{4-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-3-yl-benzylamino)-9H-purin-2-yl]-piperazin-1-yl}-ethoxy)-ethanol	C, 65.52/65.38; H, 7.01/7.11; N, 18.44/18.08	530.66	532.66
BP149	2-[2-{4-(9-Cyklopentyl-6-[[6-(2-amino-fenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-amino]-9H-purin-2-yl)-piperazin-1-yl]-ethoxy}-ethanol	C, 64.61/64.53; H, 7.05/7.02; N, 22.60/22.83	556.67	558.69
BP150	2-[2-(4-{9-Cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethoxy]-ethanol	C, 61.29/61.05; H, 6.61/6.98; N, 20.42/20.09; S, 5.84/5.62	547.70	549.72
BP151	2-[2-(4-{9-Cyklopentyl-6-[(6-pyrazol-1-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-yl}-piperazin-1-yl)-ethoxy]-ethanol	C, 60.88/61.06; H, 6.81/6.49; N, 26.30/26.05	531.65	533.64
BP152	(S)-3-[9-Cyklopentyl-6-(4-furan-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-2,4-dimethyl-pentan-2-ol	C, 68.83/68.85; H, 7.43/7.39; N, 17.20/16.89	487.65	489.62
BP153	(S)-3-[9-Cyklopentyl-6-[(6-furan-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino]-2,4-dimethyl-pentan-2-ol	C, 66.23/66.01; H, 7.21/7.38; N, 20.02/19.83	488.61	490.53
BP154	(S)-2-[9-Cyklopentyl-6-[(6-thiofen-2-yl-pyridin-3-ylmethyl)-amino]-9H-purin-2-ylamino]-3-methyl-butan-1-ol	C, 62.87/62.80; H, 6.54/6.39; N, 20.53/20.72	476.64	478.63
BP155	(S)-2-[9-Cyklopentyl-6-(4-thiofen-2-yl-benzylamino)-9H-purin-2-ylamino]-3-methyl-butan-1-ol	C, 65.52/65.29; H, 6.77/6.69; N, 17.63/17.45	475.74	477.72

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃Příklad 30 Cytotoxická aktivita nových sloučenin *in vitro*

5

Jednou z hlavních vlastností určujících možný protinádorový účinek nových sloučenin *in vivo* je jejich cytotoxicita testovaná *in vitro* na vybraných nádorových buněčných liniích. Testování cytotoxicity bývá nejčastěji založeno na sledování metabolické aktivity živých buněk. Nejčastěji používané metody pro kvantifikaci buněčné proliferace a cytotoxicity využívají (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) nebo Calcein AM. Tyto metody jsou využívány v programech pro screening nových sloučenin nebo při testování chemosensitivity.

10

V experimentech byly použity následující buněčné linie: Buněčné linie HUH-7 a PLC/PRF/5 byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM obsahujícím 10 % fetálního séra, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml). Linie HCC-1.2 (3p) a HCC-1.1 (3sp) (Zilj et al., 2009, Future Oncol, 5(8): 1169–79) a Hep3B byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI-1640 obsahujícím 10 % fetálního séra, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml) a linie HepG2 v kultivačním médiu EMEM obsahujícím 10 % fetálního séra, pyruvát sodný (0,11 g/l), penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml). Všechny buněčné linie byly udržovány za standardních kultivačních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Pro testování cytotoxicity byly buňky vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 3000 buněk na jamku (v případě linie HepG2 v počtu 10000 buněk na jamku). Následující den byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích vždy v triplicátu. Po uplynutí 72 hodinové inkubace byl k buňkám přidán zásobní roztok Calceinu AM a inkubován další hodinu. Po uplynutí této doby byla změřena fluorescence živých buněk při 485 nm/538 nm (ex/em) za pomoci přístroje Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems). Hodnoty IC₅₀ stanovující koncentraci látky, která je letální pro 50 % nádorových buněk, byly odečteny z křivek závislosti buněčné viability na koncentraci testované látky (dose-response curves). Cytotoxicita nových látek byla testována na panelu buněčných linií s různým histogenetickým původem. Významná účinnost byla zjištěna u všech testovaných nádorových linií odvozených od karcinomu jater Hep3B, PLC/PRF/5, HepG2, HUH-7, 3p a 3sp (tabulka 2) bez ohledu na mutace nebo delece genů kódujících proteiny zapojené v regulaci buněčného cyklu (Puisieux et al., 1993, FASEB J. Nov;7(14):1407–13), což naznačuje, že tyto sloučeniny by měly dosahovat srovnatelné účinnosti u nádorů s různou expresí nádorových supresorů a genů zapojených v regulaci buněčného cyklu, např. p53, Rb atd.

30

Tabulka 2: *In vitro* antiproliferační aktivita vybraných nových 2-substituovaných-6-biaryl-methylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových sloučenin v nádorových liniích odvozených od karcinomu jater (CR8 značí [[9-(1-methylethyl)-6-[[[4-(2-pyridinyl)-fenyl]methyl]amino]-9H-purin-2-yl]amino]-l-butanol).

5

Sloučenina	Inhibiční koncentrace IC ₅₀ (nM)					
	Hep3B	PLC/PRF/5	HepG2	HUH-7	3p	3sp
roskovitin	>10000	>10000	n.a.	>10000	>10000	>10000
CR8	>2000					
BP2	460	105	444	319	317	466
BP4	708	106	389	355	802	813
BP5	405	60	247	231	420	454
BP12	418	77	248	199	288	492
BP13	518	76	256	339	602	613
BP14	58	7	211	373	410	513
BP16	532	129	937	363	580	767
BP18	233	22	417	618	791	791
BP19	85	9	111	281	191	410
BP20	32	7	68	182	132	197
BP21	487	46	38	155	167	408
BP22	487	280	>1000	642	436	516
BP23	432	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	468
BP24	115	12	142	177	169	339
BP29	792	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	843
BP30	77	15	206	184	205	476
BP32	400	122	>1000	647	543	687
BP35	207	37	278	257	218	328
BP36	130	18	131	332	258	424
BP102	268	644	>1000	386	492	441
BP110	488	400	>1000	513	334	515
BP116	298	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	371

n.a.: not analyzed

10 Tabulka 3: *In vitro* antiproliferační aktivita referenčních látek v nádorových liniích odvozených od karcinomu jater.

Referenční látka	Inhibiční koncentrace IC ₅₀ (nM)					
	Hep3B	PLC/PRF/5	HepG2	HUH-7	3p	3sp
doxorubicin	0,46	0,67	1,38	1,25	0,54	0,27
cisplatina	1,28	10,15	1,38	3,62	2,71	0,72
sorafenib	3,74	4,06	5,85	2,86	4,42	6,39

Příklad 31 Kinasová inhibiční aktivita nových sloučenin

Kinasa CDK2/cyklin E byla připravena pomocí bakulovirové infekce v hmyzích buňkách Sf9 a purifikována na koloně NiNTA (Qiagen). CDK5/p35, CDK7/Cyklin H/MAT1 a CDK9/Cyklin T1 byly zakoupeny od společnosti ProQinase GmbH. Kinasová reakce probíhala za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 (pro CDK2 a CDK5) nebo peptidu (YSPTSPS)₂KK (pro CDK7 a CDK9), 15/0.15/1.5/1.5 μ M ATP (pro CDK2/CDK5/CDK7/CDK9), 0.05 μ Ci [γ -³³P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 μ l v reakčním pufru (60 mM HEPES–NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na–orthovanadát, 1.2 mM DTT, 2,5 μ g / 50 μ l PEG_{20.000})– Reakce byly zastaveny přidáním 5 μ l 3% vodného roztoku H₃PO₄. Vzorky byly naneseny na P–81 fosfo-celulózovou membránu (Whatman), která byla následně 3x promyta 0,5% vodným roztokem H₃PO₄ a usušena na vzduchu. Kinasová inhibice byla stanovena za pomoci digitálního analyzátoru obrazu FLA–7000 (Fujifilm) a byla vyjádřena jako reziduální kinasová aktivita nebo jako hodnota IC₅₀ udávající koncentraci testované látky způsobující snížení aktivity CDK na 50 %.

Jak vyplývá z tabulek 4 a 5, všechny testované sloučeniny nejen že s velkou účinností (v řádech nanomolů) inhibovaly CDK1 a CDK2, rovněž vykazovaly výraznou aktivitu vůči dalším CDK, které jsou zapojeny v řadě dalších biologických procesů. Inhibice transkripce CDK7/9 vede ke snížení hladiny proteinů zapojených v apoptose (Mcl–1, XIAP), které jsou nezbytné pro přežití nádorových buněk, zejména pak těch způsobujících onemocnění jako je například mnohočetný myelom nebo chronická lymfocytická leukémie (Chen et al., Blood. 2005 Oct 1;106(7):2513–9; MacCallum et al., Cancer Res. 2005 Jun 15;65(12):5399–407; Manohar et al., Leuk Res. 2011 Jun;35(6):821–30). CDK5, známá jako regulátor neuronálních procesů, hraje také velmi významnou úlohu v regulaci migrace endoteliálních buněk a tvorby cév, dvou pochodů nezbytných pro angiogenezi (Liebl et al., J Biol Chem. 2010 Nov 12;285(46):35932–43). Z toho důvodu byla inhibiční aktivita nejúčinnějších látek testována vůči všem CDK a dále byl studován jejich vliv na transkripci a angiogenezi.

Tabulka 4: Kinasová inhibiční aktivita vybraných 2–substituovaných–6–biarylmethylamino–9–cyklopentyl–9H–purinových sloučenin vyjádřená jako hodnota IC₅₀.

Sloučenina	Kinasová inhibice	
	IC ₅₀ (nM)	
	CDK1	CDK2
roskovitin	>1000	160
CR8	787	51
BP2	119	20,0
BP4	148	11,4
BP5	183	14,0
BP12	422	33,5
BP13	202	13,0
BP14	50,0	10,0
BP16	301	33,0
BP18	118	34,0

BP19	77,0	14,0
BP20	47,0	7,1
BP21	215	23,0
BP22	100	10,0
BP24	58,0	12,0
BP30	49,0	4,0
BP32	152	20,5
BP35	169	18,0
BP36	66,0	8,0

Tabulka 5: Kinasová inhibiční aktivita vybraných 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinových sloučenin vyjádřená jako reziduální aktivita kinas CDK5/7/9.

Sloučenina	Reziduální kinasová aktivita (%)					
	CDK5		CDK7		CDK9	
	1000 nM	100 nM	1000 nM	100 nM	1000 nM	100 nM
BP14	24,82	37,79	23,95	54,83	0,73	22,31
BP18	23,58	49,19	24,13	54,07	1,03	32,65
BP19	25,62	37,73	24,98	55,05	0,83	26,55
BP20	19,36	47,64	17,27	48,04	0,59	21,06
BP21	23,37	88,22	48,47	72,03	7,74	48,99
BP22	89,00	87,75	93,86	70,04	82,80	93,40
BP30	4,31	26,02	16,50	47,68	1,78	19,59
BP35	8,70	65,04	33,47	64,07	2,39	32,80
BP36	2,95	31,88	17,34	49,06	1,68	15,39
BP117	39,63	76,73	68,34	76,35	23,18	52,68

Příklad 32 Jednokroková analýza aktivace kaspas-3/7 novými 2-substituovanými-6-benzyl-amino-9-cyklopentyl-9H-puriny

Stanovení proapoptotických vlastností nových sloučenin bylo založeno na kvantifikaci enzymatické aktivity kaspasy-3/7. Aktivita buněčné kaspasy-3/7 byla měřena podle protokolu Carrasco et al., 2003, BioTechniques, 34(5): 1064–67. Buňky linie Hep3B a PLC/PRF/5 byly vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 10 000 buněk na jamku. Druhý den byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích a buňky byly inkubovány 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byl do jamek přidán reakční pufr (150 mM HEPES pH 7,4, 450 mM NaCl, 150 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1,2 mM EGTA, 1,5% Nonidet P40, 0,3% CHAPS, 30% sacharóza, 30 mM DTT, 3 mM PMSF) obsahující 150 μM substrát Ac-DEVD-AMC (Sigma-Aldrich) a destičky byly inkubovány při 37 °C. Aktivita kaspas-3/7 byla změřena po 6 hodinách za pomoci přístroje Fluoroskan Ascent (Labsystems) při 346 nm/442 nm (ex/em).

Měření aktivity kaspas-3/7 v buňkách linií Hep3B (Tabulka 6) a PLC/PRF/5 (tabulka 7) ovlivněných 2-substituovanými-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9*H*-puriny odhalilo koncentračně-závislou aktivaci těchto enzymů již v submikromolárních koncentracích.

5

Tabulka 6: Relativní aktivita kaspas-3/7 v buňkách linie Hep3B ovlivněných novými sloučeninami.

Sloučenina	Relativní aktivita kaspas-3/7 v buněčné linii Hep3B					
	Koncentrace (nM)					
	0	100	200	400	800	1600
BP2	1,00	-	1,09	1,40	3,73	7,77
BP4	1,00	-	1,12	1,44	5,58	9,25
BP5	1,00	-	1,09	1,48	6,65	8,96
BP12	1,00	-	1,12	4,20	7,04	9,85
BP13	1,00	-	0,95	1,71	5,65	7,81
BP14	1,00	0,99	3,60	6,55	9,00	9,50
BP16	1,00	-	0,93	1,26	2,82	7,07
BP17	1,00	-	0,89	0,87	0,96	0,63
BP18	1,00	-	0,89	3,19	6,05	8,59
BP19	1,00	0,90	4,82	6,60	9,80	9,45
BP20	1,00	4,42	5,37	8,25	9,63	9,95
BP21	1,00	-	1,15	1,18	4,36	7,19
BP22	1,00	-	0,81	0,80	0,81	1,18
BP24	1,00	1,98	6,18	6,81	9,80	9,65
BP30	1,00	2,99	5,32	8,08	9,00	9,43
BP32	1,00	-	0,70	1,15	2,48	7,53
BP35	1,00	-	1,01	5,59	6,07	9,10
BP36	1,00	2,67	6,19	6,55	9,80	9,75
BP115	1,00	-	0,94	1,05	1,19	0,81
BP117	1,00	-	0,77	0,89	1,06	2,00

10

Tabulka 7: Relativní aktivita kaspas-3/7 v buňkách linie PLC/PRF/5 ovlivněných novými sloučeninami.

Sloučenina	Relativní aktivita kaspas-3/7 v buněčné linii PLC/PRF/5						
	Koncentrace (nM)						
	0	40	80	160	320	640	1280
BP2	1,00	1,09	1,14	1,30	2,24	>5,00	>5,00
BP4	1,00	-	-	0,67	0,61	0,33	0,55
BP5	1,00	0,65	1,07	2,22	3,37	>5,00	>5,00
BP12	1,00	0,93	1,27	3,10	2,95	>5,00	>5,00
BP13	1,00	0,99	1,37	1,72	2,28	>5,00	>5,00
BP14	1,00	1,99	2,86	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP16	1,00	1,01	0,73	1,15	2,42	>5,00	>5,00
BP17	1,00	-	-	1,08	1,09	0,99	1,20
BP18	1,00	0,97	2,40	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP19	1,00	1,78	2,39	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP20	1,00	3,15	2,66	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP21	1,00	0,69	1,20	2,19	3,39	>5,00	>5,00
BP22	1,00	-	-	0,72	1,08	1,92	3,50
BP24	1,00	2,01	2,59	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP30	1,00	2,46	3,93	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP32	1,00	0,62	1,00	0,69	2,01	>5,00	>5,00
BP35	1,00	1,10	2,37	2,97	>5,00	>5,00	>5,00
BP36	1,00	2,34	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00	>5,00
BP115	1,00	-	-	1,17	1,05	0,88	0,98
BP117	1,00	-	-	0,79	1,17	2,60	2,99

5

Příklad 33 Vliv 2-substituovaného-6-biarylmetylamino-9-cyklopentyl-9H-purinu BP14 na aktivaci apoptosy

- 10 Stanovení proapoptotických vlastností sloučeniny BP14 bylo založeno na měření enzymové aktivity kaspas-3/7. Při tomto experimentu byly buňky ovlivněné látkou BP14 sklizeny centrifugací a homogenizovány v extrakčním pufru (10 mM KCl, 5 mM Hepes, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2% CHAPS, inhibitory proteas, pH 7,4) po dobu 20 minut na ledu. Poté byly vzorky centrifugovány při 10 000 g a 4 °C po dobu 20 minut. Pomocí metody dle Bradfordové byla stanovena
- 15 koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích a srovnána na stejnou hladinu. Lyzáty byly poté inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 hodin v reakčním pufru (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,3) obsahujícím 100 μM substrát Ac-DEVD-AMC (Sigma-Aldrich). Fluorescence vzniklého produktu byla změřena pomocí přístroje Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland) při 346 nm/442 nm (ex/em).

20

Sloučenina BP14 silně indukovala aktivaci kaspas-3/7 v nádorové linii Hep3B, kde bylo možné po 24 hodinovém ovlivnění buněk látkou BP14 v koncentraci odpovídající trojnásobku hodnoty

IC₅₀ pozorovat dvacetinásobný nárůst aktivity studovaných enzymů ve srovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami. Vliv látky BP14 na aktivaci kaspas bylo rovněž možné pozorovat i v případě dalších nádorových linií odvozených od karcinomu jater (obr. 2).

- 5 Účinek látky BP14 na aktivaci apoptosy byl dále ověřen studiem exprese vybraných apoptotických proteinů pomocí metody imunoblottingu. Buňky byly sklizeny, třikrát promyty vychlazeným PBS a zlyzovány v extrakčním pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P40) obsahujícím směs inhibitorů proteas a fosfatas (Sigma–Aldrich, USA). 20 µg celkových proteinů bylo separováno pomocí elektroforézy v SDS–polyakrylamidovém gelu (SDS–PAGE) a následně přeneseno na nitrocelulózovou membránu. 10 Membrány byly blokovány v roztoku PBS s 0,1% Tweenem 20 obsahujícím 5 % sušeného mléka a inkubovány přes noc se specifickými protilátkami proti proteinům PARP–1 (klon F–2; Santa Cruz Biotechnology, USA), Mcl–1 (S–19; Santa Cruz Biotechnology, USA) a β–aktin (C–4, Santa Cruz Biotechnology, USA). Všechny primární protilátky byly naředěny do blokovacího 15 roztoku. Jako sekundární byly použity protilátky konjugované s peroxidasou (králičí protilátka proti myším imunoglobulinům a prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům; DAKO, Denmark), které byly vizualizovány pomocí reagentů ECL (Amersham–Pharmacia, Little Chalfont, UK).
- 20 Sledování štěpení proteinu PARP–1, jaderného cíle caspasy–3, potvrdilo výše zmíněné výsledky. Výrazný nárůst hladiny 89–kDa fragmentu proteinu PARP–1 byl zejména patrný po ovlivnění látkou BP14 v nádorových liniích Hep3B a 3p, naproti tomu u linie HUH–7 nebyl tento efekt zaznamenán. Aktivace apoptosy byla dále studována pomocí exprese antiapoptotického proteinu Mcl–1. Ovlivnění látkou BP14 způsobilo výrazný koncentračně–závislý pokles exprese tohoto 25 proteinu zejména u linií Hep3B, PLC/PRF/5 a 3p.

Příklad 34 Indukce nádorového supresoru p53

- 30 Protinádorová aktivita látek je zvyšována jejich pozitivním vlivem na stabilizaci a aktivaci nádorového supresoru p53. p53–dependentní transkripční aktivita byla stanovena kvantifikací aktivity β–galactosidasy v buněčné linii Arn8 odvozené od melanomu, která byla vytvořena stabilní transfekcí buněk p53–responzivním reportérovým konstruktem pRGCAfoslacZ (Frebung et al., Cancer Res., 52, 1992–6976). Po 24 hodinové inkubaci s testovanými inhibitory byly buňky linie 35 Arn8 permeabilizovány 0,3% roztokem Tritonu X–100 po dobu 15 minut a následně k nim byl přidán substrát 4–methyumbelliferon–β–D–galactopyranosid (finální koncentrace 80 µM). Po uplynutí hodinové inkubace byla změřena fluorescence vzniklého produktu (4–methyumbelliferon) pomocí přístroje Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems) při 355 nm/460 nm (ex/em).
- 40 Data v tabulce 8 dokazují, že většina látek ze série 2–substituovaných–6–biarylmethylamino–9–cyklopentyl–9–purinových derivátů vykazuje koncentračně–závislý účinek na p53–regulovanou transkripci s maximální účinností v koncentračním rozsahu mezi 100 až 500 nM.

- 45 Tabulka 8: Vliv vybraných nových 2–substituovaných–6–biarylmethylamino–9–cyklopentyl–9–purinových derivátů na indukci proteinu p53 v buňkách linie Arn8 stabilně transferované (3–galactosidasovým reportérovým genem).

Sloučenina	Maximální aktivační koncentrace (nM)
roskovitin	>10000
CR8	1600
BP2	930
BP4	700
BP5	961
BP12	986
BP13	970
BP14	137
BP16	943
BP17	950
BP18	510
BP19	167
BP20	150
BP21	918
BP22	373
BP24	260
BP30	120
BP32	895
BP35	230
BP36	125
BP115	870
BP117	950

- 5 Příklad 35 Nové 2–substituované–6–biarylmethylamino–9–cyklopentyl–9H–purinové deriváty inhibují buněčnou transkripci redukcí fosforylace RNA polymerasy II

10 V buňkách linií odvozených od karcinomu jater ovlivněných látkou BP14 byla sledována hladina fosforylace RNA polymerasy II, která je substrátem CDK7 a CDK9 (obr. 3). Pro analýzu byla použita metoda imunoblottingu popsaná v příkladu 33 s využitím následujících specifických protilátek: anti–phospho RNA polymerase II (S5) (Bethyl Laboratories, USA), anti–phospho RNA polymerase II (S2) (Bethyl Laboratories, USA), anti–RNA polymerase II (klon ARNA–3, Millipore) a β –aktin (klon C4, Santa Cruz Biotechnology, USA).

15 Analýza odhalila rapidní pokles fosforylace serinu 2 a serinu 5 RNA polymerasy II zejména v buněčných liniích 3sp a Hep3B (obr. 3). Tento výsledek potvrzuje inhibici CDK7 a CDK9 na buněčné úrovni. Inhibice buněčné transkripce byla rovněž potvrzena sníženou hladinou anti–apoptického proteinu Mcl–1, který patří do skupiny proteinů s krátkým poločasem rozpadu (obr. 1).

20

Příklad 36 Anti-angiogenní efekt nových derivátů

Byly studovány potenciální anti-angiogenní účinky nových 2-substituovaných-6-biarylmethyl-amino-9-cyklopentyl-9H-purinových derivátů. Analyzovali jsme vliv na proliferaci (Tab. 9), migraci a tube formation lidských endoteliálních buněk z umbilikální vény (HUVEC). Pro určení míry proliferace po přidání testovaných látek po 24 nebo 72 h byly vysety endoteliální buňky na 96-jamkovou testovací desku. Životaschopné buňky byly detekovány pomocí roztoku Calceinu AM (Invitrogen) a změřeny na destičkovém readeru Fluoroskan Ascent (Labsystems) dle publikovaného postupu (Kryštof et al., 2011, Eur J Med Chem. 2011 Sep;46(9):4289–94).

Tabulka 9: *In vitro* antiproliferační aktivita vybraných 2-substituovaných-6-biarylmethyl-amino-9-cyklopentyl-9-purinů v lidských endoteliálních buňkách umbilikální vény (HUVECs).

Sloučenina	Inhibiční koncentrace pro buňky	
	HUVEC - IC ₅₀ (μM) ^a	
	24 h	72 h
doxorubicin	>6,6	>6,6
sorafenib	>50	>10
CR8	>50	0,61
BP4	15,7	0,45
BP14	>50	0,05
BP18	>50	0,52
BP19	21,8	0,37
BP20	29,2	0,57
BP24	>50	0,17
BP30	20,4	0,08
BP35	>50	0,18
BP36	20,8	0,19

^a Průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů

Příklad 37 Anti-angiogenní efekt nových derivátů – migrační rýhový test

Migrační test byl proveden dle publikovaného postupu (Kryštof et al., 2011, Eur J Med Chem.; 46(9):4289–94). V konfluentních HUVEC buňkách byla vytvořena rýha pomocí pipety se špičkou. Do média k buňkám byly přidány na 24 h různé koncentrace testovaných látek. Po inkubaci byla každá jamka fotografována pomocí software DP Controller systém (Olympus) připojeného k mikroskopu Olympus BX50. Migrace byla vyjádřena jako plocha rýhy nepokrytá buňkami pomocí "in house" software.

Nové 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny inhibovaly migraci HUVEC buněk stimulovaných VEGF do vytvořené rýhy v koncentracích 100 a 1000 nM (Tab.

10). Signifikantní inhibice migrace byla detekována u buněk ošetřených 100 nM BP20 a BP 30 na 24 h. Tyto koncentrace neměly vliv na buněčnou viabilitu (tab. 9).

- 5 Tabulka 10: Účinek vybraných nových 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9-purinových derivátů na migraci lidských endoteliálních buněk umbilikální vény (HUVEC).

Sloučenina	Oblast rýhy ^a	
	koncentrace (nM)	
	100	1000
olomoucín	0	0
rosvovitin	0	0
CR8	0	+
BP4	0	++
BP14	+	++
BP18	+	++
BP19	+	++
BP20	++	++
BP24	+	++
BP30	++	++
BP35	0	++
BP36	+	++

^a++ otevřená; + částečně otevřená, 0 uzavřená

Příklad 38 Anti-angiogenní účinek nových derivátů – tube formation

V dalším z angiogenních testů, tzv. tube formation, se HUVEC buňky v médiu (Endothelial Cell Growth Medium, Provitro, Německo) obsahující testované látky, vysejí na Matrigel® (BD) do
 15 ibidi slidů pro angiogenezi (15-jamkové, ibidi GmbH, Mnichov, Německo). Po 24 h jsou pořízeny fotografie jednotlivých jamek pomocí mikroskopu Olympus BX50 se softwarem DP Controller system. Vyhodnocení schopnosti buněk tvořit tzv. tubuly bylo vyjádřeno pomocí "in house"
 20 software jako počet tubulů a počet uzlů buněk ošetřených testovanými látkami v porovnání s neošetřenými buňkami.

Mnoho 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9-purinů redukovalo signifikantně migraci HUVEC buněk v testovaných koncentracích 10 a 100 nM (Obr. 5). Např. látky BP14 a BP20 po 24 h redukovaly u HUVEC buněk počet tubulů, jejich celkovou délku nebo
 25 průměr délky jednoho tubulu a počet větvení (obr. 5). Např. látky BP14 a BP20 po 24 h redukovaly u HUVEC buněk počet tubulů, jejich celkovou délku nebo průměr délky jednoho tubulu a počet větvení (obr. 5).

Příklad 39 Protizánětlivá aktivita nových derivátů – pokles exprese E-selectinu

Jedním z testů prokazujících protizánětlivý účinek 2-substituovaných-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purinů je měření exprese E-selectinu (ELAM-1–endotheliální-leukocytová adhezivní molekula 1). ELAM-1 patří do skupiny glykoproteinů buněčného povrchu, které jsou rychle indukovány zánětlivými cytokiny během chronického nebo akutního zánětlivého procesu (Ley, Trends Mol Med. 2003 Jun;9(6):263–8), např. nádorový nekrotický faktor (TNF α). Z tohoto důvodu jsme analyzovali vliv nových derivátů na expresi membránově vázaného E-selectinu na buňkách HUVEC po aplikaci TNF α pomocí vysoce citlivé metody ELISA.

Buňky HUVEC byly vysazeny do 96-jamkové desky, která byla předem potažena 200 μ l 0,25% roztokem kolagenu G na 10 min při 37 °C. 1×10^4 buněk HUVEC bylo vyseto do 200 μ l média a rostly 48 h do optimální konfluence. Testované inhibitory byly přidány ve vzrůstající koncentraci v triplicátech do jamek s buňkami HUVEC a inkubovány 30 min. Následně bylo do jamek s testovanými látkami přidáno 10 ng/ml TNF α pro stimulaci produkce NF- κ B a tedy i ELAM-1. Po další 4 h inkubaci byly změřeny hladiny ELAM-1 v jednotlivých jamkách s HUVEC buňkami pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Buňky byly jednou promyty PBS a fixovány 15 min při pokojové teplotě 25% glutaraldehydem (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo). Následně byly buňky promyty 3x 200 μ l na jamku PBS/0,05% Tween 20, blokovány 200 μ l/jamka 5% BSA/PBS 1 h a znovu opláchnuty 3x 200 μ l na jamku PBS/0,05% Tween 20. Potom byla přidána na 1 h při pokojové teplotě protilátka anti-ELAM-1 (klon BBA-1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), ředěná 1:5000 v 0,1% BSA/PBS (100 μ l na jamku), a nakonec promyta 5x 200 μ l na jamku PBS/0,05% Tween 20. Následně byly buňky inkubovány 1 h při pokojové teplotě ve tmě se sekundární protilátkou goat anti-mouse-HRP (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo) ředěné 1:10000 v 0,1% BSA/PBS (100 μ l na jamku). Po odstranění protilátky byly buňky promyty 5x 200 μ l na jamku PBS/0,05 % Tween 20. HRP-aktivita v každé jamce byla změřena po přidání Fast-OPD substrátu (o-fenylendiamin dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo) (Gridling et al, Int J Oncol. 2009, Apr;34(4):117–28) a absorbance byla změřena při OD_{492nm} ve spektrofotometru. Všechna data byla normalizována k pozitivní kontrole (buňky ošetřené TNF bez inhibitoru), která reprezentuje 100% zánětlivých buněk.

Vybrané 2-substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny způsobily rychlý pokles exprese ELAM-1 v nanomolárních koncentracích, které neovlivňovaly životaschopnost buněk (data nejsou ukázána). Výsledky jasně ukazují, že většina nových sloučenin jsou výrazně účinnější než referenční látka doxorubicin (DOX) nebo sorafenib (SOR). Např. puriny BP36 a BP30 jsou mezi nejaktivnějšími sloučeninami této série s inhibicemi pod 25 % (pro koncentraci 1 μ M).

Příklad 40 Účinky BP14 in vitro a in vivo

Pro detailnější zhodnocení účinků BP14 *in vitro* a *in vivo* byly využity následující materiál a metody:

Buněčné kultury: Lidské nádorové linie odvozené od karcinomu jater HepG2, PLC/PRF/5 (PLC), Hep3B a 3sp (původně popsány jako HCC-1.1) byly kultivovány v médiu RPMI 1640 obsahujícím 10 % fetálního séra jak bylo popsáno (Schneller et al., 2011, Hepatology, 54:164–72; van Zijl et al., 2011, Mol Cancer Ther, 10:850–620). Všechny linie byly uchovávány při teplotě 37 °C a 5% CO₂ a rutinně testovány na absenci mykoplazmy.

Primární lidské hepatocyty: Nenádorové vzorky tkáně z resekce jater byly získány od pacientů podstupujících částečnou hepatektomii z důvodu kolorektálního karcinomu metastazujícího do jater. Experimentální postupy byly provedeny v souladu s pokyny charitativní státem kontrolované nadace HTCR (Human Tissue and Cell Research, Regensburg, Německo), s informovaným

souhlasem pacienta schváleným místní etickou komisí University v Regensburgu. Primární lidské hepatocyty byly izolovány za použití modifikovaného dvoukrokového postupu EGTA/kolagenasové perfuze, jak bylo popsáno dříve (Armeanu et al., 2003, Cancer Res, 63:2369–72). Viabilita vyizolovaných hepatocytů byla stanovena pomocí trypanové modři a buňky s viabilitou vyšší než 85 % byly využity pro další práci. Buňky byly vysazeny na kolagenem–potažené misky (BD Biosciences, San Jose, USA) v hustotě $1,2 \times 10^5$ buněk/cm² a kultivovány v kultivačním médiu DMEM obsahujícím 10 % fetálního séra, 2 mM L–glutamin, streptomycin (100 mg/ml), penicillin (100 U/ml), insulin (125 mU/ml), glukagon (7,3 ng/ml) a hydrokortison (0,8 µg/ml). Buňky byly kultivovány při 37 °C a 5% CO₂ s každodenní výměnou média

Stanovení buněčné viability a inhibiční koncentrace IC₅₀: Buněčná viabilita byla sledována s využitím 3–(4,5 dimethylthiazol–2–yl)–2,5–difenyltetrazolium bromidu (MTT). Buňky byly nasazeny v triplicátu v hustotě 6000 buněk na jamku. Následující den bylo k buňkám na dobu 72 hodin přidáno kultivační médium obsahující testovanou látku. Buňky byly inkubovány s roztokem MTT (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA). Po 5 hodinách bylo médium vyměněno za DMSO. Za pomoci destičkového readeru (Asys HiTech, Salzburg, Rakousko) byla při 620 nm změřena absorbance. Hodnoty IC₅₀ byly získány log–lineární interpolací dat z křivek koncentrační závislosti za použití softwaru GraphPad Prism® 5.01.

Kinasové inhibiční testy využívající bezbuněčné extrakty: Extrakty byly připraveny zlyzováním buněk Hep3B v pufru obsahujícím 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA a 0,5% NP–40. 100 µg extraktu bylo při 4 °C použito na dobu 4 hodin pro imunoprecipitaci s 1 µg protilátky proti CDK2 (M2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) nebo s 1 µg protilátky proti cyklinu B1 (GNS1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Vyprecipitované proteiny byly třikrát promyty lyzačním pufrem, poté jednou kinasovým pufrem (50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂ a 1 mM DTT) a následně resuspendovány ve 20 µl kinasového pufru obsahujícího 5 µCi [γ –³²P]ATP (PerkinElmer, Santa Clara, USA), 1 µg histonu H1 (New England Biolabs, Ipswich, USA) a příslušnou koncentraci inhibitoru. Po uplynutí doby inkubace (60 minut při 30 °C), byl supernatant povařen ve vzorkovacím pufru obsahujícím 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β–merkaptoethanol a 0,02% bromfenolovou modř. Proteiny byly rozděleny pomocí SDS–PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla obarvena Ponceau S pro kontrolu rovnoměrného nanesení vzorků a zanalyzována pomocí autoradiografie.

Kinasové inhibiční testy: Kinasy CDK1/cyklin B1 a CDK2/cyklin E byly připraveny pomocí bakulovirové infekce v hmyzích buňkách Sf9 a purifikována na koloně NiNTA (Qiagen), zatímco CDK5/p35, CDK7/Cyklin H/MAT1 a CDK9/Cyklin T1 byly zakoupeny od společnosti ProQinase GmbH (Freiburg, Německo). Kinasová reakce probíhala za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 (pro CDK2 a CDK5) nebo peptidu (YSPTSPS)₂KK (pro CDK7 a CDK9), 15/0,15/1,5/1,5 µM ATP (pro CDK2/CDK5/CDK7/CDK9), 0,05 µCi [γ –³²P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 µl v reakčním pufru (60 mM HEPES–NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na–orthovanadát, 1,2 mM DTT, 2,5 µg / 50 µl PEG_{20.000}). Reakce byly zastaveny přidáním 5 µl 3% vodného roztoku H₃PO₄. Vzorky byly nanášeny na P–81 fosfo–celulózovou membránu (Whatman, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA), která byla následně 3x promyta 0,5% vodným roztokem H₃PO₄ a usušena na vzduchu. Kinasová inhibice byla stanovena za pomoci digitálního analyzátoru obrazu FLA–7000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Koncentrace testované látky potřebná pro pokles aktivity CDK na 50 % byla určena z křivek koncentrační závislosti a označena jako IC₅₀.

Analýza proliferace: 6×10^4 buněk bylo vysazeno do 12–jamkových panelů a 3 dny inkubováno s různými koncentracemi inhibitoru. Počet buněk byl stanoven v různých časových intervalech po ztrypsinizování s využitím automatizovaného buněčného počítáče (CASY, Schärfe Systems, Reutlingen, Německo). Experiment byl proveden ve třech nezávislých opakováních.

Analýza tvorby kolonií: Pro analýzu vzniku a růstu kolonií buněčných populací bylo 500 buněk, předem ovlivněných na 24 hodin látkou BP14 nebo neovlivněných kontrolních buněk, vysazeno do šesti–jamkových panelů a inkubováno 10 dní ve standardním kultivačním médiu při 37 °C a 5% CO₂. Kolonie byly zafixovány směsí methanol/kyselina octová (3:1) a nabarveny 0,25% roz-

tokem krystalové violeti. Krystalová violet ze zafixovaných buněk byla rozpuštěna 1% SDS a poté byla fotometricky změřena její absorbance při 560 nm.

Analýza buněčné proliferace pomocí inkorporace 5-bromo-2-deoxy-uridinu (BrdU): Inkorporace BrdU do buněčného jádra přímo odpovídá buněčné proliferaci. Kultivované buňky byly po dobu 1 hodiny pěstovány v médiu obsahujícím 10 μ M BrdU pro naznačení DNA. Po odstranění média byly buňky zafixovány a DNA denaturována fixačním/denaturačním roztokem obsahujícím 2M HCl po dobu 30 minut při 37 °C. Pro analýzu inkorporace BrdU *in vivo*, 200 μ l Ringero-
 5 va roztoku s 1 mg BrdU bylo formou intraperitoneální injekce podáno myším s xenografem karcinomu jater 2 hodiny před analýzou. Myši byly usmrceny, nádorová tkáň zafixována v 4% formaldehydu a zpracována pro imunohistochemii. Inkorporace BrdU do buněčné DNA byla detekována za použití monoklonální protilátky proti BrdU (Sigma, St. Louis, USA). Následně byly vzorky inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidásou (Calbiochem, LaJolla, USA) ředěnou 1:10000.

Průtoková cytometrie: Analýza obsahu buněčné DNA byla provedena s využitím přístroje BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Před samotným cytofluorometrickým měřením bylo asi 5×10^5 buněk promyto fosfátovým pufrům (PBS), zafixováno 70% ethanolem, znovu promyto PBS a pro označení buněčné DNA následně 10 minut inkubováno v přítomnosti 100 μ g/ml RNasy A a 50 μ g/ml propidium jodidu. Procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo stanoveno s využitím softwaru od stejného výrobce.

Stanovení dlouhodobé chemosensitivity: Buňky odvozené od karcinomu jater byly kontinuálně kultivovány v přítomnosti látky BP14 v koncentracích nižších než je její hodnota IC_{50} ($1/2 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$, $1/8 IC_{50}$ a $1/16 IC_{50}$). Vznik chemorezistentních buněk byl monitorován každých 6 týdnů pomocí MTT testu. Buňky vykazující vyšší hodnotu IC_{50} po ovlivnění inhibitorem oproti kontrolním neovlivněným buňkám jsou považovány jako chemorezistentní.

Imunoblotting: Imunoblotting byl prováděn, jak bylo popsáno dříve (Gotzmann et al., 2002, J Cell Sci, 115:1189–202). Primární protilátky byly použity v ředěních: anti-phospho-Ser5 RNA Pol II (CDK7; Bethyl Laboratories, Montgomery, USA), 1:1000; anti-phospho-Ser2 RNA Pol II (CDK9; Bethyl Laboratories, Montgomery, USA), 1:1000; anti-RNA Pol II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 1:1000; anti-PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, USA),
 30 1:1000; anti- β -aktin (Sigma, St. Louis, USA), 1:2500. Sekundární protilátka konjugovaná s křenuvou peroxidásou (Calbiochem, LaJolla, USA) byla použita v ředění 1:10000.

Tvorba xenograftu hepatocelulárního karcinomu a účinek testované látky: 5×10^6 nádorových buněk odvozených od karcinomu jater bylo resuspendováno ve 100 μ l Ringero-
 35 va roztoku a subkutánně vneseno do myší s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (Severe Combined Immunodeficiency SCID) (Harlan Laboratories, San Pietro, Italy). Velikost nádoru byla stanovena podle postupu popsaného dříve (Gotzmann et al., 2002, J Cell Sci, 115:1189–202). Po dobu 17 dní byla myším s vytvořeným nádorem každý den pomocí intraperitoneální injekce podávána BP14 (1 mg/kg) ve 100 μ l 0,01% DMSO. Kontrolním myším s nádory bylo injikováno pouze 100 μ l 0,01% DMSO. Všechny zvířecí experimenty byly prováděny podle rakouských směrnic o péči a ochraně zvířat.
 40

Diethylnitrosamin-indukovaná rakovina jater a účinek testované látky: Pro iniciaci vzniku nádoru v játrech byla 14 dní starým C57BL/6J myším pomocí intraperitoneální injekce podána jedna dávka diethylnitrosaminu (DEN, 25 mg/kg). Po 8 měsících byla u DEN-indukovaných myší zahájena farmakologická intervence třemi desetidenními cykly podávání testované látky se sedmi-
 45 denními pauzami mezi jednotlivými cykly. 1 mg/kg BP14 ve 100 μ l 0,01% DMSO byl podáván formou intraperitoneálních injekcí. Kontrolní myši dostávaly pouze 100 μ l 0,01% DMSO. Poté byly myši usmrceny a játra zafixována ve 4% formaldehydu. Dva vědečtí pracovníci nezávisle zaznamenali průměry vytvořených nádorů, které byly pozorovatelné na povrchu jater. Rakovinné noduly s průměrem do 1 cm, pokrývající více než 97 % všech viditelných hepatomů, byly zahr-
 50 nuty do analýzy. Méně než 3 % hepatomů s větším průměrem byly vyloučeny z analýzy z důvo-

du předpokladu, že větší tumory nemusí správně reagovat na působení testované látky. Všechny zvířecí experimenty byly prováděny podle rakouských směrnic o péči a ochraně zvířat.

Imunohistochemie: Myši byly usmrceny a nádory zafixovány jak bylo popsáno dříve (Zulehner et al., 2010, Am. J. Pathol., 176:472–81). 4 µm silné tkáňové řezy zalité v parafínu byly nabarveny hematoxylinem a eosinem (H&E). Při imunohistochemii byly tkáňové řezy nabarveny protilátkou anti-BrdU (Sigma, St. Louis, USA) v ředění 1:200. Biotinylované sekundární protilátky byly použity v ředění 1:200. Imunoperoxidasová reakce byla provedena za použití kitu Vectastain Elitě ABC (Vector Laboratories, CA, USA) podle postupu výrobce.

Statistická analýza: Data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Statistická významnost rozdílů byla vyhodnocena s využitím nepárového, neparametrického Studentova t-testu. Signifikantní rozdíly mezi experimentálními skupinami byly * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ nebo *** $p < 0.005$.

Cytotoxicita a kinasová specifita BP14: Testování buněčné viability ukázalo výrazný cytotoxický účinek BP14 na lidské buněčné linie HepG2 a PLC odvozené od karcinomu jater stejně jako na buněčné linie Hep3B a 3sp (obr. 7A). Vyhodnocení křivek koncentrační závislosti na buněčné viabilitě odhalilo hodnoty IC_{50} pod 0,5 µM u různých hepatocelulárních nádorových linií (Tab. 11). Kinasové testy využívající bezbuněčné extrakty ukázaly, že BP14 významně redukuje aktivitu CDK1 a CDK2 v koncentracích 0,03 µM (Obr. 7B). Navíc vystavení buněk linií HepG2 a PLC látce BP14 v koncentracích nižších než 1 µM mělo za následek výraznou redukci fosforylace RNA polymerasy II na serinu 5 (CDK7) a serinu 2 (CDK9), naznačující inhibici aktivity CDK7 a CDK9 (Obr. 7C). Kvantifikace inhibice CDK za využití rekombinantních CDK substrátů odhalila pro látku BP14 hodnoty IC_{50} mezi 0,01 a 0,05 µM včetně účinků proti CDK5 (Tab. 12). Tyto výsledky tedy potvrzují data získaná pomocí metody využívající bezbuněčné extrakty. Tato data naznačují, že látka BP14 dosahuje vysoké cytotoxické účinnosti na buněčné linie odvozené od hepatocelulárního karcinomu díky specifické inhibici CDK 1 /CDK2/CDK5/CDK7 a CDK9.

Tabulka 11: *In vitro* antiproliferační aktivita látky BP14 v nádorových liniích odvozených od karcinomu jater.

Buněčná linie	IC_{50} (µM)
	BP14
HepG2	0,12
PLC	0,02
Hep3B	0,08
3sp	0,48

Tabulka 12. Kinasová inhibiční aktivita látky BP14 vyjádřená jako hodnota IC_{50} .

Proteinkinasa	IC_{50} (µM)
	BP14
CDK1/cyklin B	0,050
CDK2/cyklin E	0,010
CDK5/p25NCK	0,015
CDK7/cyklin H/Mat1	0,292
CDK9/cyklin T	0,007

BP14 brání tvorbě kolonií a blokuje progresi buněčného cyklu: Byla pozorována více než patnáctinásobná redukce tvorby kolonií po ovlivnění buněk HepG2 a PLC látkou BP14 v koncentraci 0,2 µM (Obr. 8A). Analýza syntézy DNA odhalila, že ovlivnění buněk HepG2 a PLC látkou

BP14 v koncentraci 1 μM snížilo inkorporaci BrdU ve srovnání s kontrolou více a než dvakrát (Obr. 8B). Sledování kinetiky proliferace odhalilo cytostatický účinek látky BP14 v koncentraci 0,2 μM jak u linií HepG2 a PLC, tak i v případě buněk Hep3B (obr. 9). Látka BP14 indukovala akumulaci buněk HepG2 a PLC v G2 fázi buněčného cyklu (obr. 8C). Tato data naznačují, že BP14 působí antiproliferačně díky inhibici replikace DNA a blokování buněk odvozených od hepatocelulárního karcinomu v G2 fázi buněčného cyklu.

BP14 indukuje apoptosu v buňkách odvozených od karcinomu jater spíše než v primárních lidských hepatocytech: Byla testována indukce apoptosy BP14 v buňkách HepG2 majících wild-type p53 a v buňkách PLC exprimujících p53 v mutované formě (Ferlay et al., 2010, Int J Cancer., 127(12):2893–917). Působení 0,2 μM BP14 indukovalo štěpení proteinu PARP a expresi p53 v buňkách HepG2 i v p53–mutantních PLC buňkách (obr. 10A). Naproti tomu BP14 neindukovala štěpení proteinu PARP v primárních lidských hepatocytech (obr. 10B). Rovněž BP14 vykazovala v případě primárních lidských hepatocytů hodnotu $\text{IC}_{50}=20,08 \mu\text{M}$, což je více než devadesáti–násobně vyšší hodnota než v případě buněk HepG2 (tab. 11). Tato data ukazují, že látka BP14 indukuje v nízkých koncentracích apoptosu v buňkách odvozených od karcinomu jater nezávisle na p53 a nedosahuje těchto cytotoxických účinků u primárních lidských hepatocytů.

Dlouhodobá cytotoxicita BP14 u buněk odvozených od hepatocelulárního karcinomu: Bylo sledováno, zda-li BP14 vykazuje změny v cytotoxických účincích při dlouhodobé kultivaci buněk odvozených od karcinomu jater v přítomnosti nízkých koncentrací BP14 (poloviční koncentrace IC_{50} a nižší) až po dobu 9 měsíců. Předpokládá se, že v případě snížení chemosensitivity vlivem vytvoření mechanismů rezistence, dojde u buněk odvozených od hepatocelulárního karcinomu ke zvýšení hodnot IC_{50} . Bylo prokázáno, že hodnoty IC_{50} pro buněčné linie odvozené od karcinomu jater jsou i přes dlouhodobou kultivaci v přítomnosti BP14 udržovány pouze s nepatrnými odchylkami (tab. 13). Tato data ukazují, že cytotoxický účinek BP14 na tyto buňky je zachováván a buňky se vůči BP14 nestávají chemorezistentními.

Tabulka 13: Trvalá cytotoxicita u buněk odvozených od karcinomu jater dlouhodobě vystavených látce BP14

	IC_{50} for BP14 (μM)	
	HepG2	Hep3B
kontrola (μM)	0,32	0,53
1/2 IC_{50} (μM)	0,59	0,80
1/4 IC_{50} (μM)	0,45	0,45
1/8 IC_{50} (μM)	0,39	0,38
1/16 IC_{50} (μM)	0,27	0,42

Inhibice modelu xenograftů a DEN–indukovaných karcinomů jater látkou BP14: Vliv BP14 byl testován na modelech xenograftů karcinomů jater odvozených od linií HepG2 a PLC. Myši s vytvořeným tumorem byly ošetřovány látkou BP14 v maximální tolerovatelné koncentraci (MTD; 1 mg/kg). Působení BP14 mělo za následek výraznou redukci velikosti nádorů xenograftů vytvořených buňkami HepG2 a PLC (obr. 11 A). BP14 dokonce vedla k ústupu PLC nádorů. Analýza počtu pozitivních buněk v S fázi v nádorech odvozených od HepG2 a PLC buněk pomocí inkorporace BrdU odhalila dvojnásobný pokles počtu těchto buněk po expozici látce BP14 (obr. 11B a 11C).

Dále byla analyzována schopnost BP14 inhibovat rozvoj rakoviny jater, která byla chemicky indukována hepatotoxinem DEN. Podávání látky BP14 DEN–indukovaným myším zahrnovalo tři desetidenní cykly se sedmidenními přestávkami (obr. 12A). Vyhodnocení velikosti nádoro-

vých nodulů, které byly pozorovatelné na povrchu jater, odhalilo, že BP14 způsobila snížení jejich velikosti 1,3x ve srovnání s kontrolou (obr. 12B a 12C). Tato data naznačují, že BP14 dosahuje výrazných účinků *in vivo* jak v případě modelu xenograftů hepatocelulárního karcinomu, tak i v případě endogenní rakoviny jater.

5

Příklad 41 Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin vzorce I z tab. 1 nebo 2, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

<u>Složení</u>	
Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
15 Pšeničný škrob	120 g
Magnezium stearát	80 g
Laktóza	20 g

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

20

Příklad 42 Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek obecného vzorce I jako aktivní složky se připraví následujícím postupem:

<u>Složení</u>	
Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

30 Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 µm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

35

Příklad 43 Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I jako aktivní ingredience se připraví následujícím postupem:

40

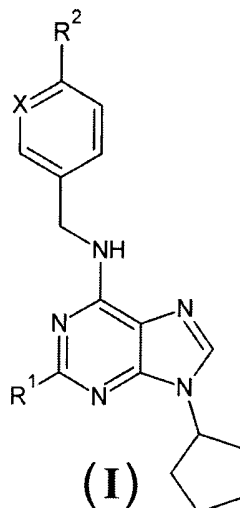
<u>Složení</u>	
Aktivní složka	250 g
PEG 400	1 litr
Tween 80	1 litr

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

50

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny obecného vzorce I



ve kterém

10

X je CH nebo N,

R1 je vybráno ze skupiny zahrnující

- 15 (4-aminocyklohexyl)amino,
 (2-aminocyklohexyl)amino,
 (3-aminocyklohexyl)amino,
 (4-hydroxycyklohexyl)amino,
 [(2R)-1-hydroxybutan-2-yl]amino,
 (2-hydroxy-2-methylpropyl)amino,
 20 (3-hydroxy-3-methylbutyl)amino,
 [(3S)-2-hydroxy-2,4-dimethylpent-3-yl]amino,
 piperazin-1-yl,
 4-methylpiperazin-1-yl,
 morfolin-4-yl,
 25 [(1S)-1-(dimethylamino)-2-hydroxyethyl]amino,
 [(3R)-2-hydroxypent-3-yl]amino,
 (3-hydroxypropyl)amino,
 (2-aminoethyl)amino,
 (3-aminopropyl)amino,
 30 (2-aminopropyl)amino,
 4-(aminomethyl)piperidin-1-yl,
 (piperidin-4-ylmethyl)amino,
 4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]piperazin-1-yl,
 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl

35

a

R2 je vybrán ze skupiny zahrnující

- substituovaný fenyl, ve kterém jsou substituenty v jakékoliv poloze a substituenty jsou vy-
 brány ze skupiny zahrnující OH, OCH₃, NH₂, Cl, Br, F, I, COOH, NO₂,
 2-pyridyl,
 40 3-pyridyl,

4-pyridyl,
 2-furanyl,
 3-furanyl,
 thien-2-yl,
 thien-3-yl,
 pyrazol-1-yl,
 pyrazol-3-yl,
 pyrazol-4-yl,
 pyrrol-1-yl,

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

2. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle nároku 1 obecného vzorce I ve formě (R) nebo (S) isomerů v případě chiralit v pozici R2.

3. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle kteréhokoliv předcházejících nároků pro použití jako léčiva.

4. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití pro inhibici angiogeneze v živočišných buňkách.

5. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití při léčbě zahrnující potlačení zánětlivých onemocnění.

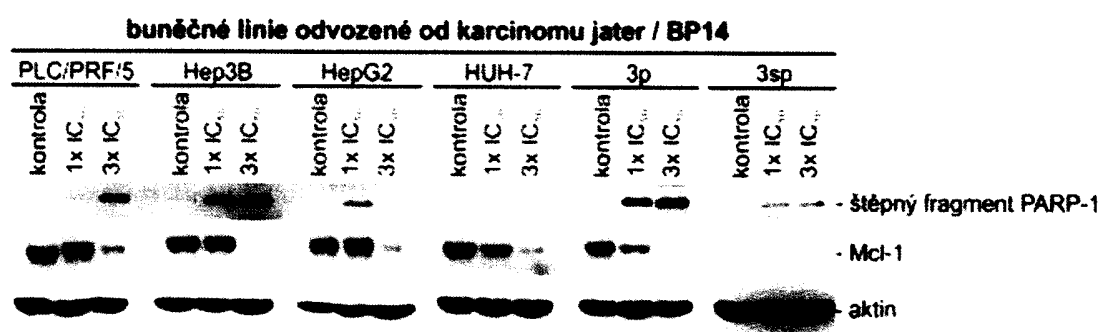
6. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití při léčbě nádorů.

7. 2-Substituované-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-puriny podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití při léčbě hepatocelulárních karcinomů nebo/a metastazujících hepatocelulárních karcinomů.

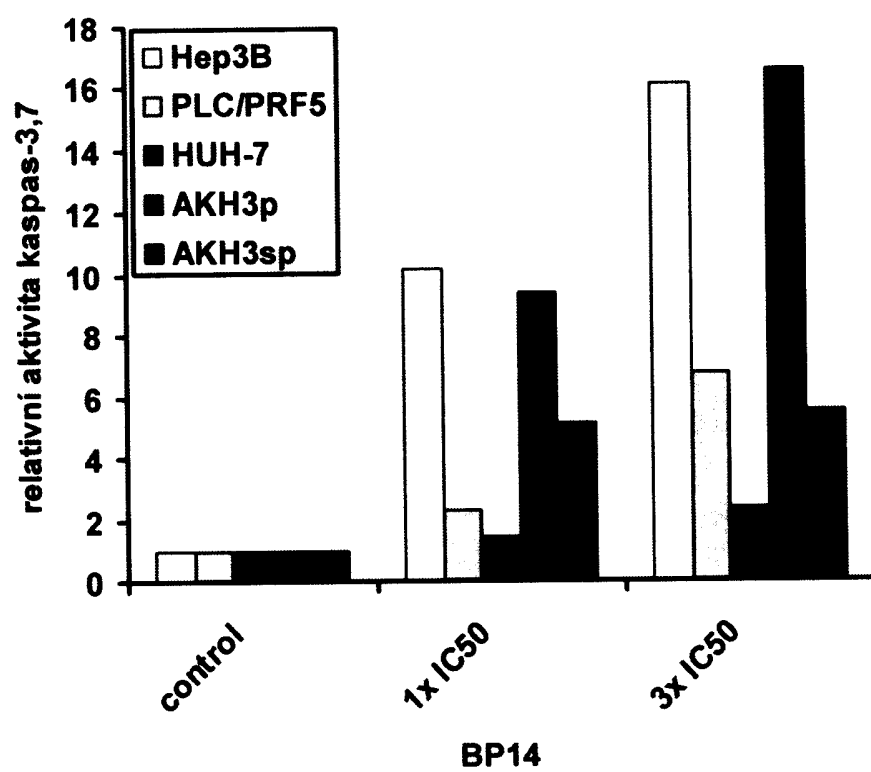
8. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jeden 2-substituovaný-6-biarylmethylamino-9-cyklopentyl-9H-purin podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 a farmaceuticky přijatelný nosič.

9. Farmaceutický přípravek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jedno další protinádorové agens vybrané ze skupiny zahrnující cis-platinu, doxorubicin nebo sorafenib.

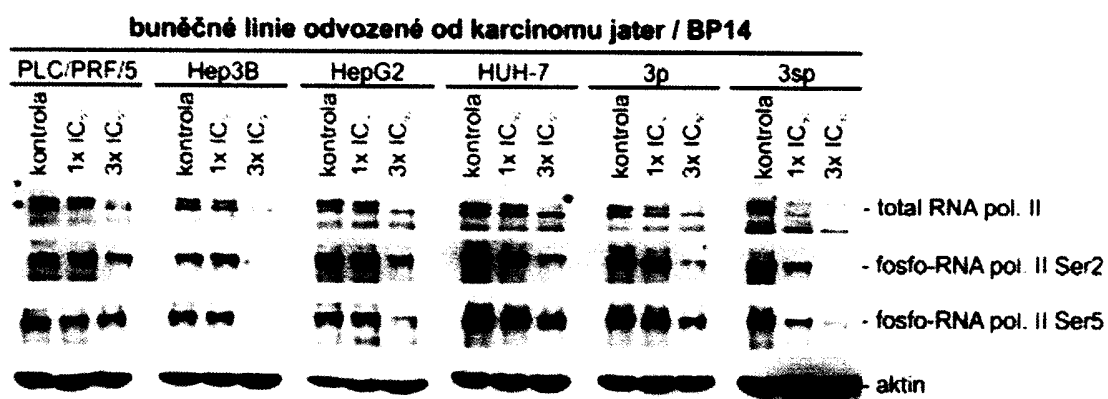
Obr. 1



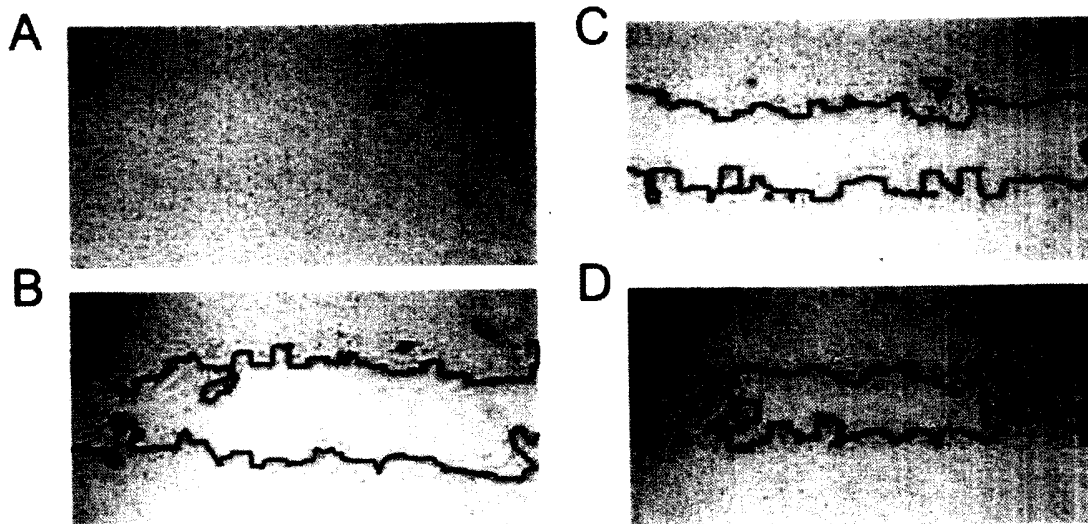
Obr. 2



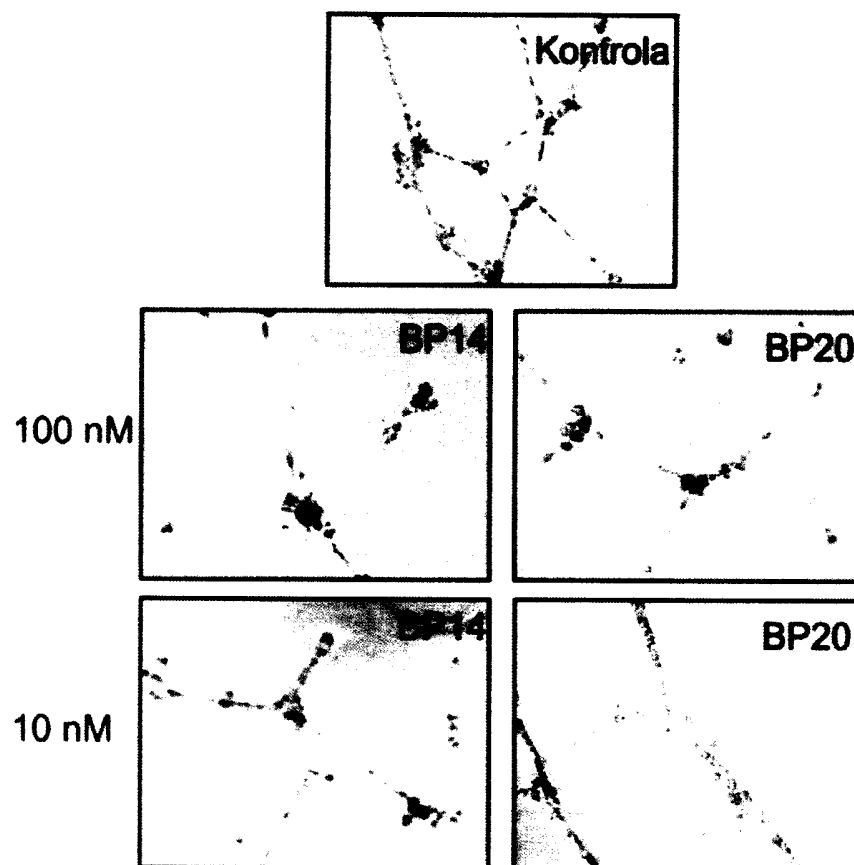
Obr. 3



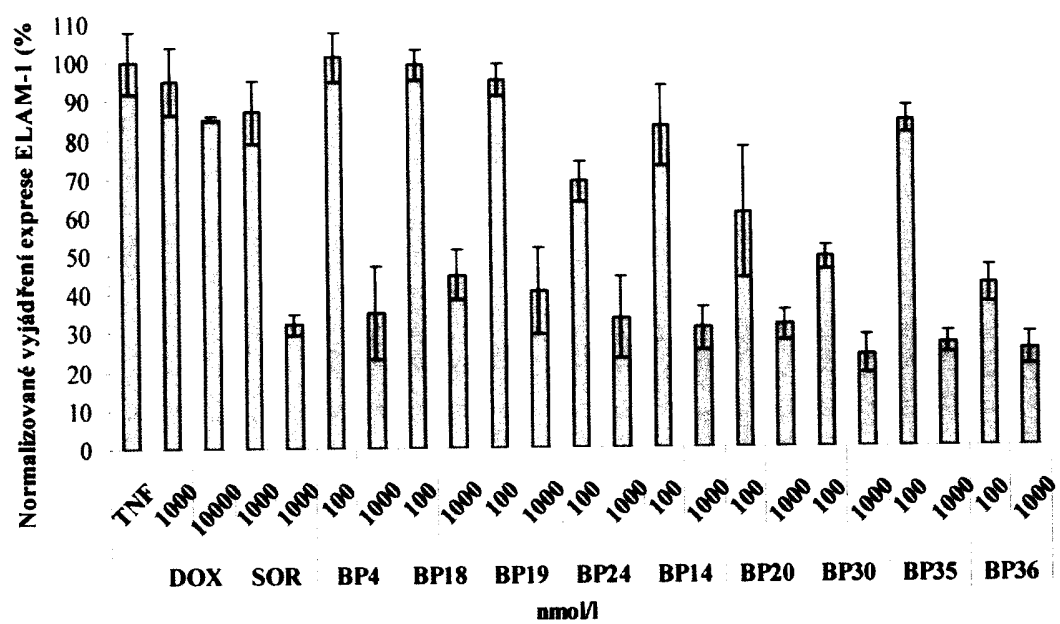
Obr. 4



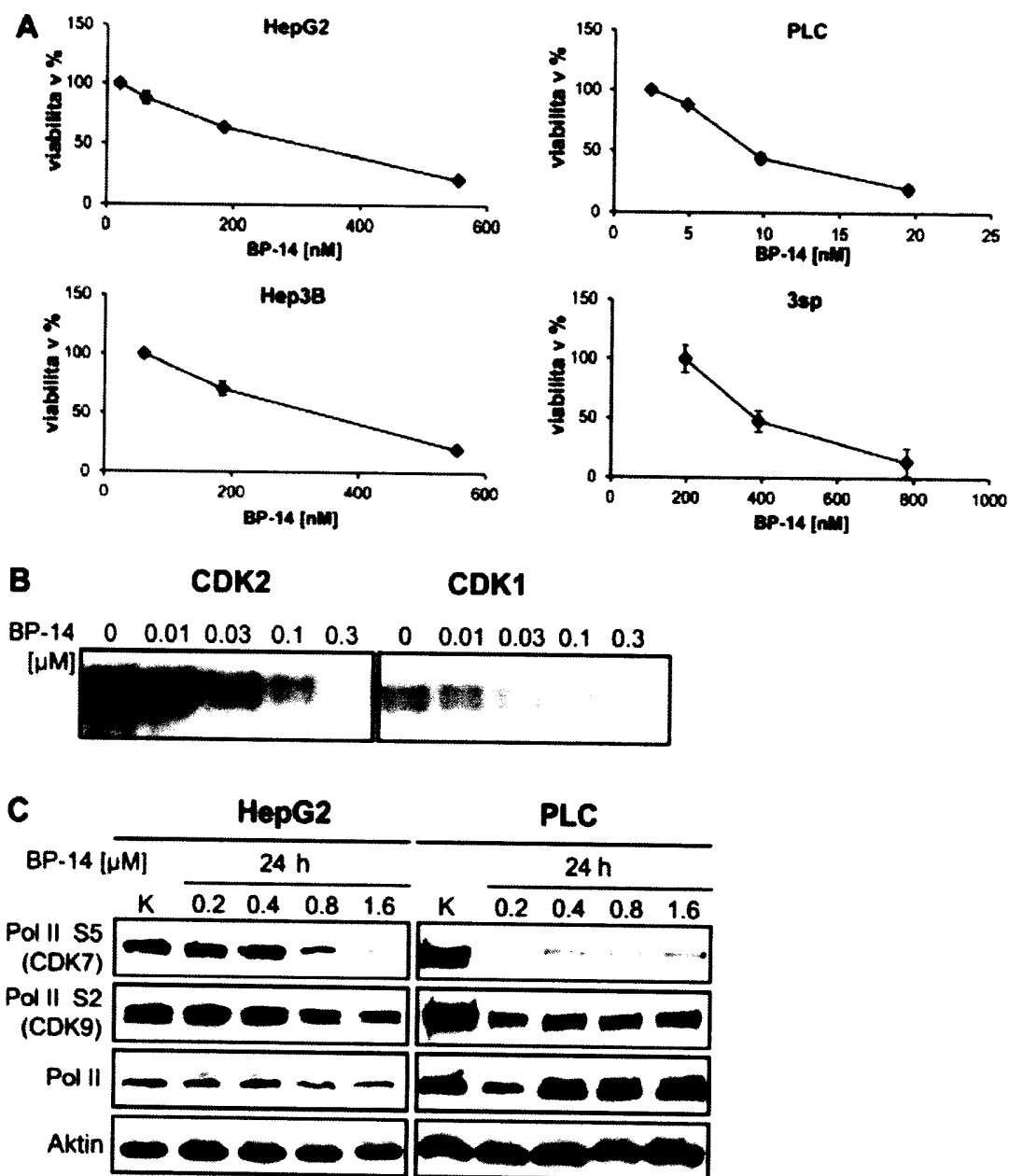
Obr. 5



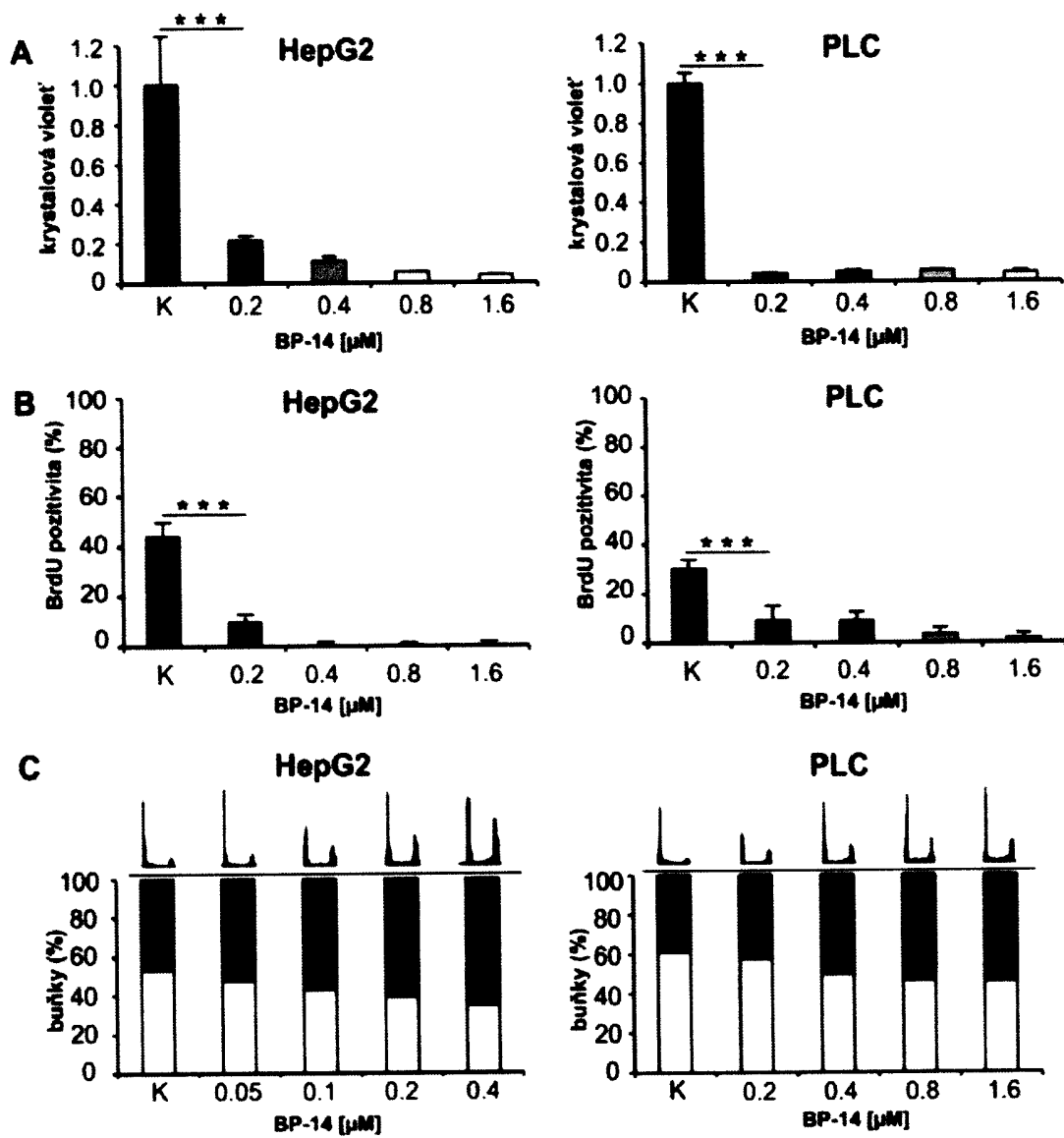
Obr. 6



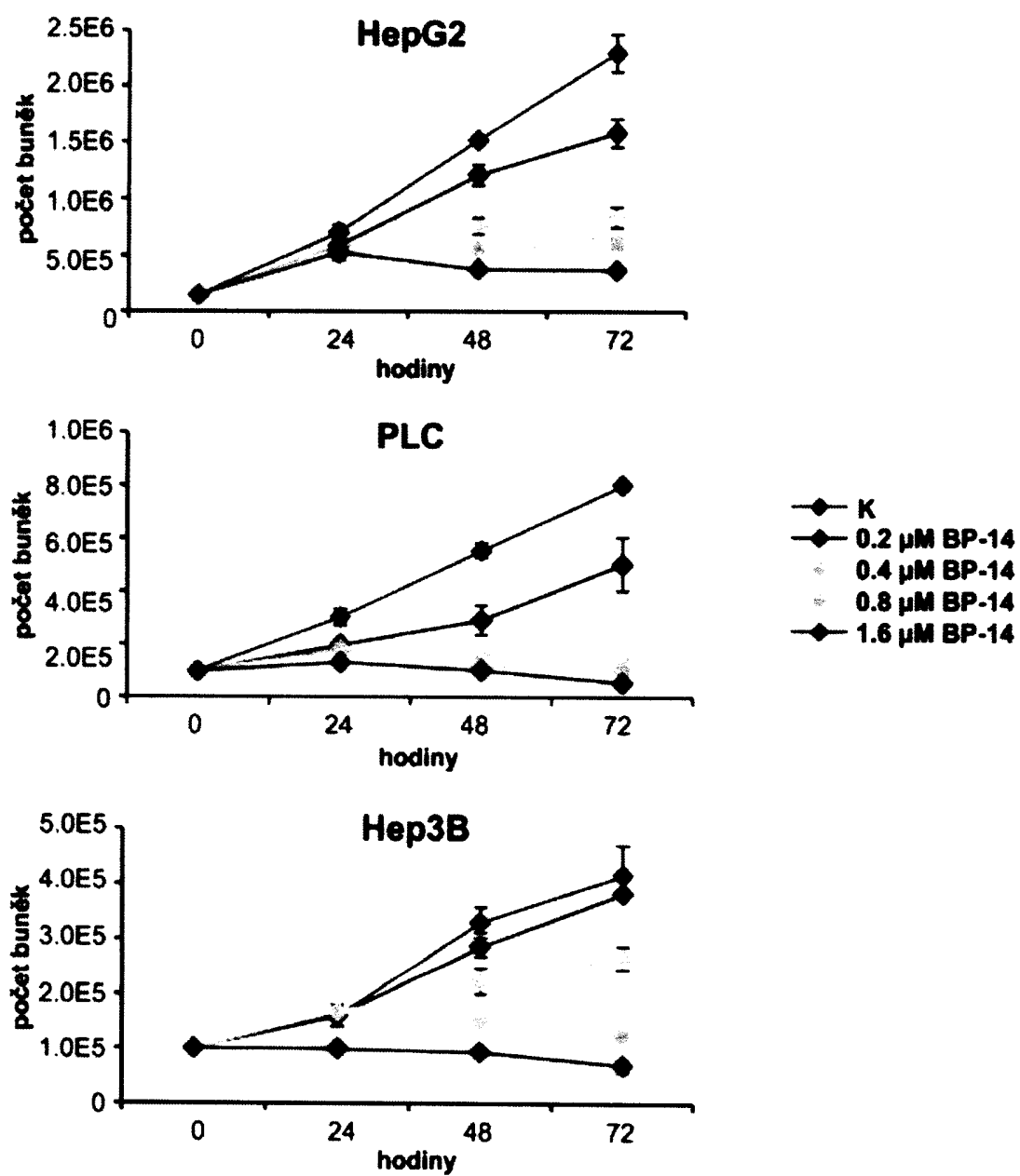
Obr. 7



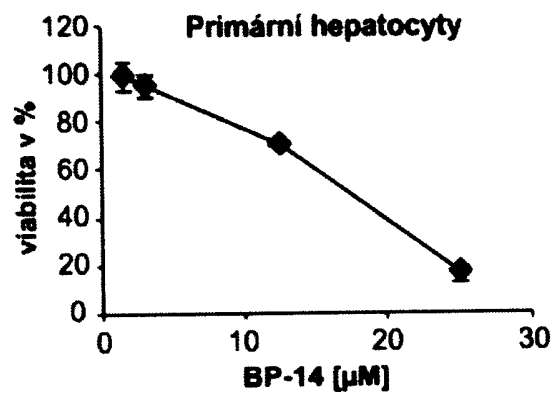
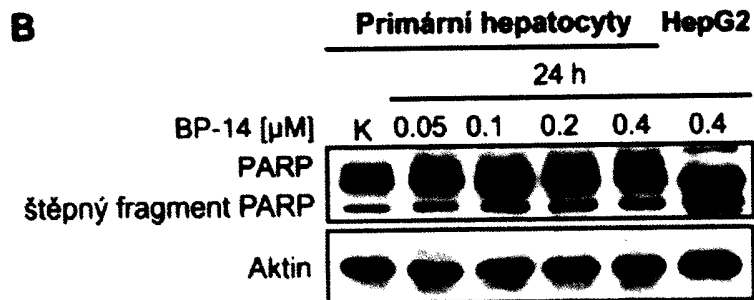
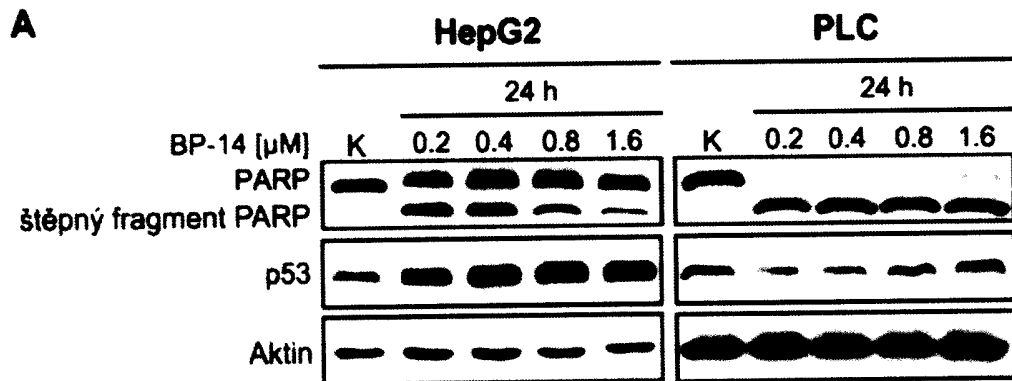
Obr. 8



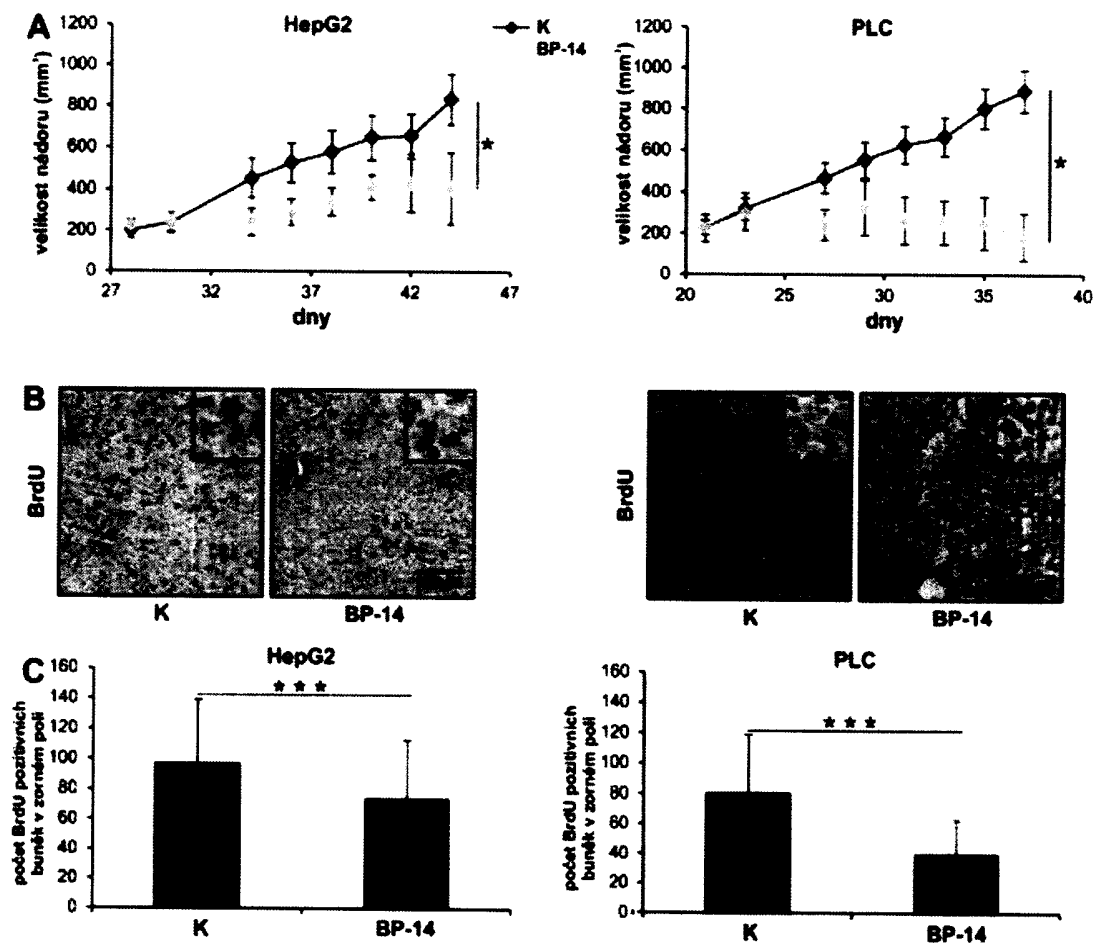
Obr. 9



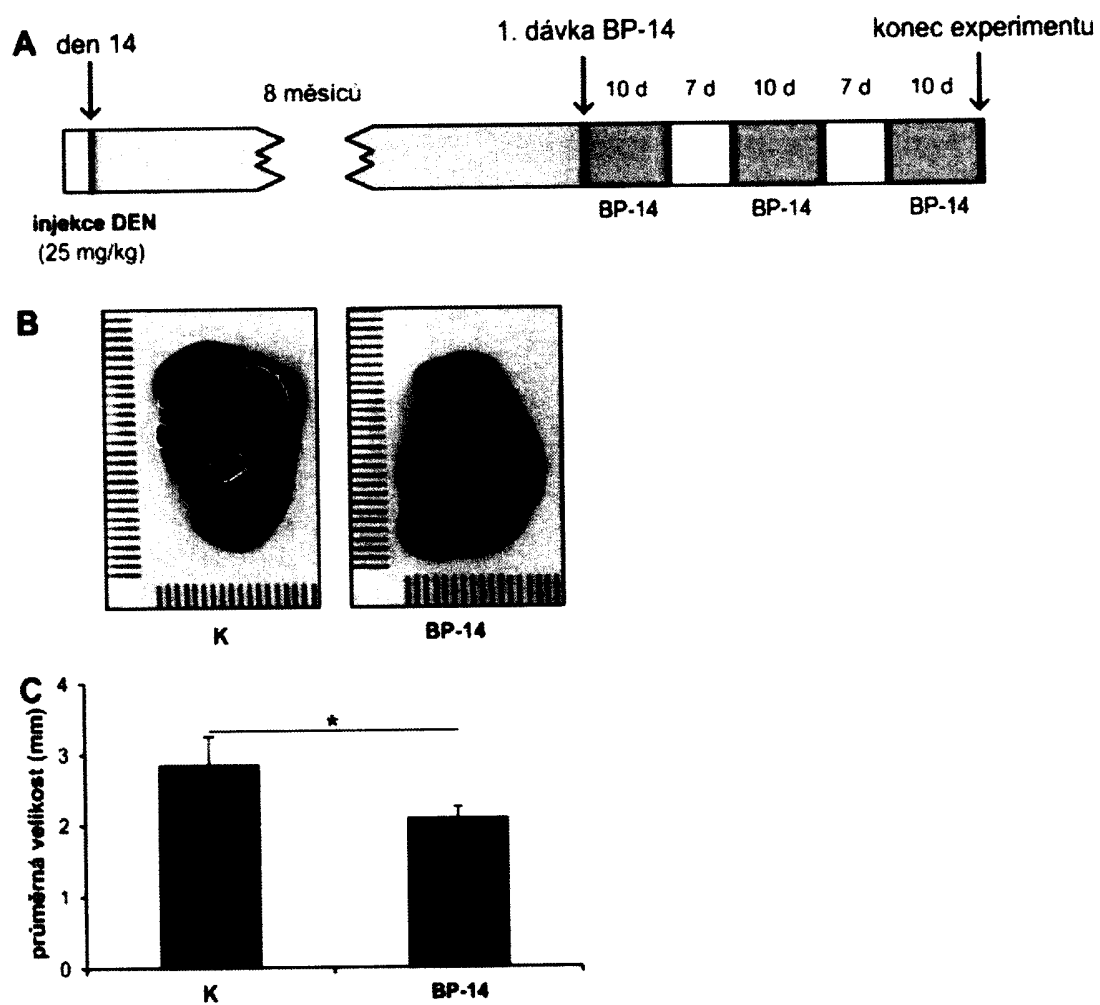
Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12



Konec dokumentu