

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra organické chemie



**Syntéza, studium reaktivity a biologické aktivity derivátů  
uracilu substituovaného v poloze C5 a N1.**

*BAKALÁŘSKÁ PRÁCE*

Autor:

Ivana Mejdrová

Studijní obor:

Bioorganická chemie B1407

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Brulíková

**Olomouc 2011**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, za použití literatury, která je citována a uvedena na konci bakalářské práce.

V Olomouci dne 28.4.2011

.....  
Ivana Mejdrová

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat především RNDr. Lucii Brulíkové za obětavou pomoc, trpělivost, neutuchající motivaci a důvěru, cenné připomínky a rady při řešení a zpracování dané problematiky. Ráda bych poděkovala všem pracovníkům Katedry organické chemie PŘF UP za ochotu a pomoc a v neposlední řadě mé rodině za trpělivost a podporu.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

**Jméno a příjmení autora:** Ivana Mejdrová

**Název práce:** Syntéza, studium reaktivity a biologické aktivity derivátů uracilu substituovaného v poloze C5 a N1

**Typ práce:** Bakalářská

**Pracoviště:** Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

**Vedoucí práce:** RNDr. Lucie Brulíková

**Rok obhajoby:** 2011

### **Abstrakt:**

Syntetické modifikace přírodních nukleobází reprezentují významnou a neustále se rozvíjející oblast výzkumu nukleových kyselin. Jednu ze složek nukleových kyselin představuje uracil a jeho modifikacím v poloze C5 a N1 je věnována předložená bakalářská práce. Samotný text je členěn na část teoretickou a experimentální.

Teoretická část shrnuje dosavadní známé přípravy a studie selektované skupiny derivátů uracilu modifikovaných v poloze C5 variabilními diaminovými či karboxamidovými funkcemi. Na závěr teoretické části je uveden výčet biologických vlastností nejzajímavějších derivátů se zaměřením na cytotoxickou a antivirovou aktivitu a studie související s ovlivněním struktury DNA přítomnou modifikací v poloze C5.

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na vývoj účinné syntézy derivátů uracilu substituovaných v poloze C5 variabilním karboxamidovým zbytkem navázaným přes alifatický či aromatický linker s možností následné modifikace v poloze N1 za tvorby acyklických nukleosidů. Nejdříve byla vyvíjena metodika přípravy aminoalkyl(aryl)aminomethyluracilů, kdy se podařilo úspěšně syntetizovat pouze derivát s aromatickým diamino linkerem. Podobné deriváty v řadě alifatické vzhledem ke své reaktivitě poskytovaly směsi mono a disubstituovaných analog. Dále byla věnována značná pozornost přípravě karboxamidových derivátů. Navzdory pestré paletě zvolených přístupů žádný z nich nevedl k uspokojivým výsledkům. Substituce polohy N1 za tvorby acyklických nukleosidů byla na závěr vzhledem k předchozím neúspěšným syntézám zkoumána na derivátech alkoxyethyluracilu. Celá práce je završena návrhem alternativních postupů využívajících solid-phase syntézu.

**Klíčová slova:** Uracil, biologická aktivita, diamin, karboxamid.

**Počet stran:** 54

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** Český

## BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

**Author's first name and surname:** Ivana Mejdrová

**Title:** Synthesis, study of reactivity and biological activity of C5 and N1 modified uracil analogues.

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of Organic Chemistry, Faculty of Science,  
Palacký University Olomouc

**Supervisor:** RNDr. Lucie Brulíková

**The year of presentation:** 2011

### **Abstrakt:**

Synthetic modifications of natural nucleobasis represent an important and constantly developing field of nucleic acids research. One of nucleic acid components is uracil and the submitted bachelor thesis is interested in its C5 and N1 modifications. Text is divided into theoretical and experimental part.

The theoretical part summarizes known synthetic approaches and studies on selected group of C5 modified uracil analogues bearing various diamino and carboxamide moiety. At the end of the theoretical part, there is a brief overview of biological properties of the most interesting derivatives, especially focused on anticancer and antiviral activity. Theoretical part also presents studies related to the influences of C5 modifications on the DNA duplex formation and stability.

The experimental part of this work is aimed at the development of an efficient synthesis of uracil derivatives substituted at the C5 position with variable carboxamide group attached through aliphatic or aromatic linker, with a subsequent possibility of N1 modification leading to acyclic nucleosides. Firstly, the synthetic approach for preparation of aminoalkyl(aryl)aminomethyluracil has been developed. However, only aromatic diamino derivative was successfully prepared. Aliphatic analogues afforded mixture of mono- and diacylated compounds due to their higher reactivity. Further the attention was paid to the preparation of carboxamide derivatives. In spite of the wide range of synthetic approaches, none of them led to the satisfactory results. Since the previous attempt at preparation of desired derivatives failed, the substitution of N1 was carried out on the alkoxymethyluracil analogues. The whole bachelor thesis is closed by suggestions of an alternative methods using solid-phase synthesis.

**Keywords:** Uracil, biological activity, diamine, carboxamide.

**Number of pages:** 54

**Number of appendixes:** 0

**Language:** Czech

# OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Cíl bakalářské práce.....	11
3. Teoretická část.....	12
<b>3.1. Metody přípravy vedoucí ke známým derivátům diaminouracilu.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. 5-(4-Aminobutylaminomethyl)uracil.....	12
3.1.2. 5-(2-Aminoethylaminomethyl)uracil.....	13
3.1.3. Analoga methyldiamino-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridinu.....	14
3.1.4. Syntéza aminofenylaminomethyl analog uracilu.....	15
<b>3.2. Biologická aktivita.....</b>	<b>16</b>
3.2.1. Cytotoxická aktivita platnatých komplexů diaminoalkyluracilů.....	16
3.2.2. Antivirotická a cytotoxická aktivita analog C5 modifikovaných 2',3'- nenasycených uridinů.....	17
3.2.3. Biologické studie putrescinylthyminu.....	18
<b>3.3. Metody přípravy vedoucí ke známým karboxamidovým         derivátům uracilu.....</b>	<b>20</b>
3.3.1. Syntéza oligonukleotidů s karboxamidovou modifikací uracilu.....	20
3.3.2. Analoga thymidinu pro neradioaktivní nukleosidové značení DNA.....	23
3.3.3. Syntéza polyakrylamidů uracilu.....	24
4. Diskuze a výsledky.....	26
4.1. Příprava výchozího 5-chloromethyluracilu.....	26
4.2. Příprava aminoalkyl/arylaminomethyluracilů a jejich izolace.....	27
4.3. Alternativní metoda přípravy diamino derivátů uracilu.....	33
4.4. Příprava karboxamidů uracilu a jejich izolace.....	33
4.5. Syntéza synthonů s následnou substitucí chloromethylderivátu.....	39
4.6. Alternativní metoda přípravy karboxamidů.....	41
4.7. Syntéza alkyl/arylaminomethyl derivátů.....	42
4.8. Metody přípravy acyklických nukleosidů.....	44
5. Experimentální část.....	47
6. Závěr.....	49
7. Literatura.....	52

## SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
AIBN	azobisisobutyronitril
BAL	kyselý labilní linker (backbone amid linker)
BrmUra	5-bromomethyluracil
CC	sloupcová chromatografie (column chromatography)
CEM-SS	lidské lymfoblastoidní T buňky – buněčná linie
CDI	karbodiimid
CPG	DNA Nucleoside Controlled Pore Glass
d4T	2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidin
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DIC	diisopropylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DMTrCl	dimethoxytritylchlorid
DIPEA	diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSd	disubstituovaný
EDA	ethylendiamin (ethan-1,2-diamin)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
EtAc	ethyl acetát
HDA	hexylendiamin (hexan-1,6-diamin)
HMDS	hexamethyldisilazan
hmUra	5-hydroxymethylenuracil
HOBt	7-hydroxybenzotriazol
IC <sub>50</sub>	poloviční maximální koncentrace inhibice (the half maximal inhibitory concentration)
LC-MS	kapalinová chromatografie – hmotností spektrometrie (liquid chromatography - mass spectroscopy)
MeOH	methanol
MSd	monosubstituovaný
MT- 4	metallothionein 4
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

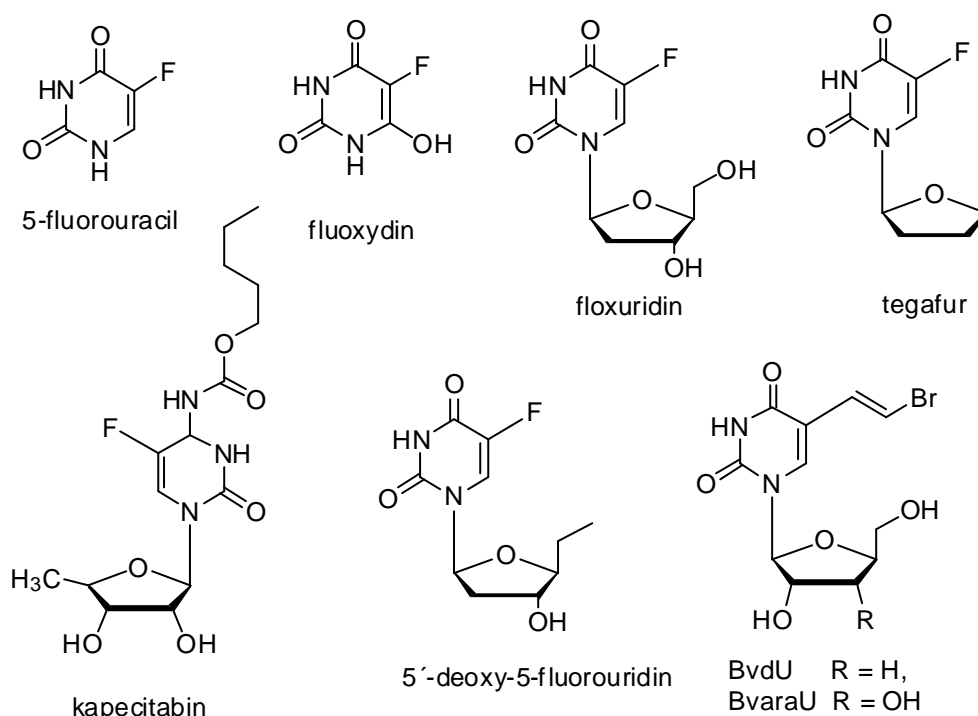
ODN	oligodeoxynukleotid
ON	přes noc (over-night)
PDA	propylendiamin (propan-1,3-diamin)
PhDA	fenylendiamin (benzen-1,4-diamin)
putThy	putrescinylthymín
R <sub>f</sub>	retardační faktor
RT	laboratorní teplota (room temperature)
RVO	rotační vakuová odparka
SE	standardní chyba –(standard error)
T	thymín
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
TMS	trimethylsilan
TMSCl	trimethylsilylchlorid
TNP	2,4,6-trinitrofenyl
TNBS	trinitrobenzensulfonát
VL	výchozí látka
WSC.HCl	1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)karbodiimid · HCl



# 1. ÚVOD

Pyrimidinová analoga tvoří početnou skupinu protinádorových chemoterapeutik. Jejich syntéza se začala rozvíjet od 50. let minulého století po zjištění, že rychle proliferující tkáně, především nádory, využívají pro syntézu nukleových kyselin uracil, kdežto v normálních tkáních je prekurzorem kyselina orotová.<sup>1</sup> Cíleně byl tedy připraven 5-fluorouracil (Obr. 1) jako strukturní analog uracilu Heidelbergerem v roce 1957 a stal se jedním z nejprozkoumanějších cytostatik. Po jeho objevu následovala syntéza dalších C5 substituovaných derivátů uracilu, které jsou v dnešní době významné svými protinádorovými či antivirovými účinky (Obr. 1). Jsou jimi např. cytostatika floxuridin, tegafur, 5'-deoxy-5-fluorouridin, fluoxydin (4-hydroxykarbamoyl-5-fluorouracil), nověji připravený kapecitabin s výhodným perorálním použitím působící jako "prodrug" 5-fluoruracilu či cytostatikum UFT obsahující tegafur a uracil.

Důležitou třídu nukleosidů s antivirovými účinky zastupují např. idoxen (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin (BvuD) či (*E*)-5-(2-bromovinyl)-1- $\alpha$ -D-arabinofuranosyluracil (BvaraU) s významnou anti-varicela zoster virovou aktivitou.<sup>2</sup>



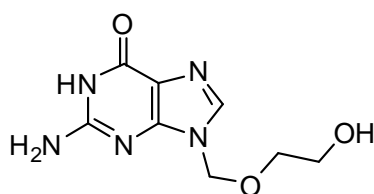
**Obr. 1.** Známé deriváty uracilu s kancerostatickými a antivirovými účinky.

Terapeutický efekt nukleosidových derivátů je často doprovázen značnými vedlejšími účinky a toxicitou, účinná látka je enzymaticky degradována a mnohé přípravky se potýkají s omezenou biodostupností či nutností častého užívání. Proto

byly sledovány vlivy substitucí heterocyklické báze či cukerné složky, které by měly výše zmíněné nevýhody eliminovat.

Vliv modifikace heterocyklické báze může být demonstrován na již uvedených derivátech (*Obr. 1*), nicméně tyto látky představují jen zlomek studovaných. Jedna z mnoha oblastí výzkumu analog uracilu, která stojí za povšimnutí, je věnována výzkumu derivátů uracilu substituovaných v poloze 5 variabilním karboxamidovým zbytkem.<sup>3-5</sup> Přítomnost amidové vazby ve struktuře účinné látky hraje klíčovou roli z hlediska medicínální chemie, což také dokazuje fakt, že podle „Comprehensive Medicinal Chemistry database“ je karboxamidová vazba zahrnuta ve více než 25% známých léčiv. Karboxamidy jsou neutrální, stabilní a mají hydrogenakceptorní i hydrogendonorní vlastnosti.<sup>5</sup>

Neméně důležitou roli ovšem hraje i cukerná složka daného nukleosidu. Nukleosidová analoga musí být enzymaticky konvertována na odpovídající trifosfáty, aby bylo dosaženo jejich účinku. Za tímto účelem byly připraveny 5'-monofosfáty, avšak první generace nukleosidových analogů, která byla designována na principu maximální podobnosti, trpěla nízkou katabolickou stabilitou, zejména vůči hydrolýze a fosforolýze. Další generace tzv. acyklických nukleosidů<sup>6,7</sup> a jejich fosfonátů<sup>8-10</sup> však zaznamenala mnohem větší úspěch. Můžeme jmenovat acyclovir (*Obr. 2*), připravený v 70. letech<sup>11</sup>. Výhodou otevřené acyklické cukerné části je schopnost mimikovat glykosylový zbytek a flexibilita acyklického řetězce umožňuje přizpůsobení se enzymové interakci, ať už v roli substrátu či inhibitoru.<sup>2</sup>

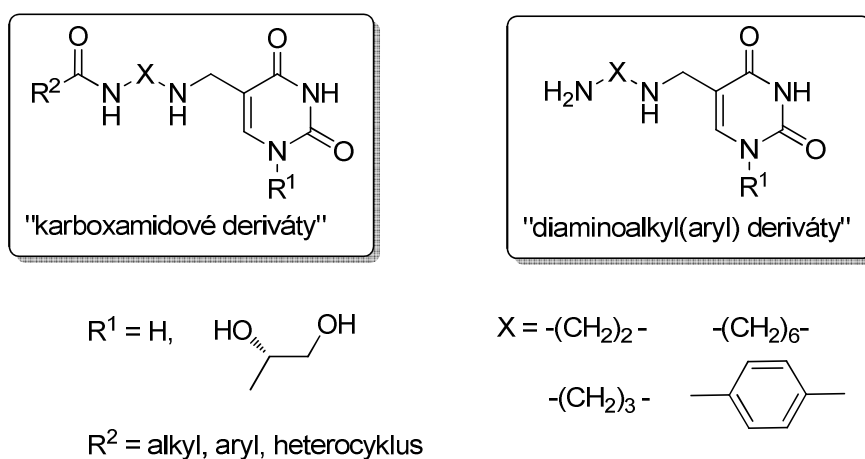


**Obr. 2.** Acyclovir

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se výzkum na poli syntézy derivátů uracilu modifikovaných v poloze C5 karboxamidovým zbytkem jeví velice zajímavým nejen z hlediska chemické reaktivity, ale i biologické aktivity. Proto se této oblasti věnuje i předložená bakalářská práce.

## 2. Cíl bakalářské práce

Předložená bakalářská práce si kladla za cíl připravit deriváty uracilu substituované v poloze C5 variabilním karboxamidovým zbytkem s následnou možností modifikace těchto derivátů včetně jednotlivých intermediátů a to v poloze N1 za tvorby acyklických nukleosidů (Obr. 3).



Obr. 3. Struktura cílových derivátů.

Jednotlivé dílčí cíle bakalářské práce lze shrnout následovně:

- Příprava 5-diaminoalkyl/aryl derivátů uracilu.
- Syntéza karboxamidových derivátů.
- Substituce polohy N1 derivátů uracilu (*R*)-(+)-glycidolem za tvorby acyklických nukleosidů.
- Studium potenciální cytotoxické či antimikrobiální aktivity připravených derivátů.

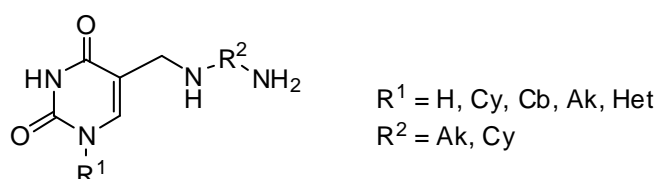
Jednou ze zajímavých možností syntézy je příprava derivátů mající přes amidový linker navázaný chinolonový skelet. 2-Fenyl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolony již prokázaly významné výsledky v oblasti cytotoxické aktivity,<sup>4</sup> a proto i jejich spojení s modifikovanou bází může vnést do studia těchto látek zajímavé výsledky. Jedním z potenciálů těchto látek může být i využití fluorescenčních vlastností chinolonového skeletu ke studiu komplexních biologických systémů.

### 3. Teoretická část

Teoretická část bakalářské práce je členěna do dvou podkapitol podle klíčové struktury. První z nich je věnována syntéze a biologické aktivitě aminoalkyl(aryl)aminomethyl derivátům uracilu. Druhá podkapitola pojednává o možnostech syntézy vybraných karboxamidových derivátů uracilu.

#### 3.1. Metody přípravy vedoucí ke známým derivátům diaminouracilu

Syntéze aminoalkyl(aryl)aminomethyl derivátů uracilu (Obr. 4) se věnuje jen malý počet publikací. Literatura převážně referuje o některých alifatických diaminoderivátech uracilu, přičemž největší pozornost je věnována 5-(4-aminobutylaminomethyl)uracilu, který se vyskytuje přirozeně v DNA bakteriofágu  $\phi$ W-14. Vzhledem k jeho přirozenému výskytu bylo tomuto derivátu věnováno několik studií zaměřených na sledování vlivu C5 modifikace uracilu na fyzikálně chemické vlastnosti nukleové kyseliny. Této problematice se věnuje samostatná kapitola předložené práce.



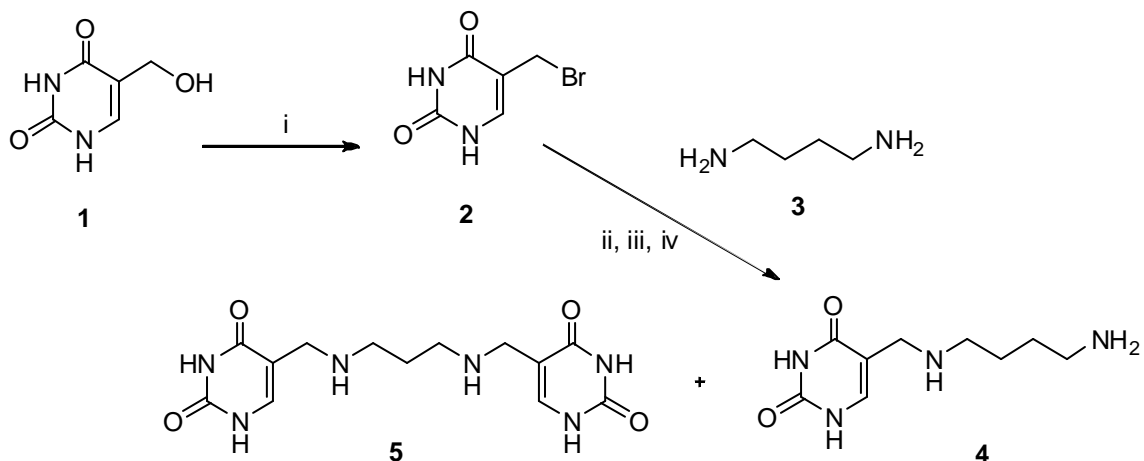
**Obr. 4.** Obecná struktura diaminoderivátů uracilu.

##### 3.1.1. 5-(4-Aminobutylaminomethyl)uracil

Prvním připraveným aminoalkylaminomethyl derivátem byl 5-aminobutylaminomethyluracil **4** již v roce 1973 (Schéma 1).<sup>12</sup> Podnětem syntézy bylo zjištění, že v DNA bakteriofágu  $\phi$ W-14 (bakteriofág monotypu A1, přirozeným hostitelem *Pseudomonas acidovorans*  $\phi$ W14, *Myoviridae*)<sup>12</sup> je až 50% thyminu nahrazeno modifikovanou bází 5-(4-aminobutylaminomethyl)uracilem **4**. Tato změna má za následek vyšší hustotu DNA a vyšší teplotu tání biomakromolekuly. Tato sloučenina byla nazvána thyminylputrescin, nověji také  $\alpha$ -putrescinylthymin (dále jen putThy) a je od svého objevu intenzivně studována na poli syntetickém i biologickém.

Výchozí komponentou pro přípravu 5-aminobutylaminomethyluracilu **4** byl

5-hydroxymethyluracil **1**, který byl převeden metodou Carbona<sup>13</sup> (1960) na 5-bromomethyluracil **2**. Reakcí 5-bromomethyluracilu **2** s nadbytkem volného putrescinu **3** za RT po dobu 30min a následným okyselením roztoku koncentrovanou HCl byl získán precipitát, který byl částečně rozpuštěn přidáním malého množství vody. Nerozpuštěný precipitát představoval nezreagovaný 5-BrmUra **2** a disubstituovaný putrescin **5**, který byl odstraněn centrifugací. Produkt **4** byl následně izolován a chromatograficky purifikován ze supernatantu.



i) 32% HBr, ledová CH<sub>3</sub>COOH, ΔT, 8h; ii) RT, 30 min; iii) HCl, H<sub>2</sub>O;  
iv) Sephadex G-10; Bio- Gel P-2

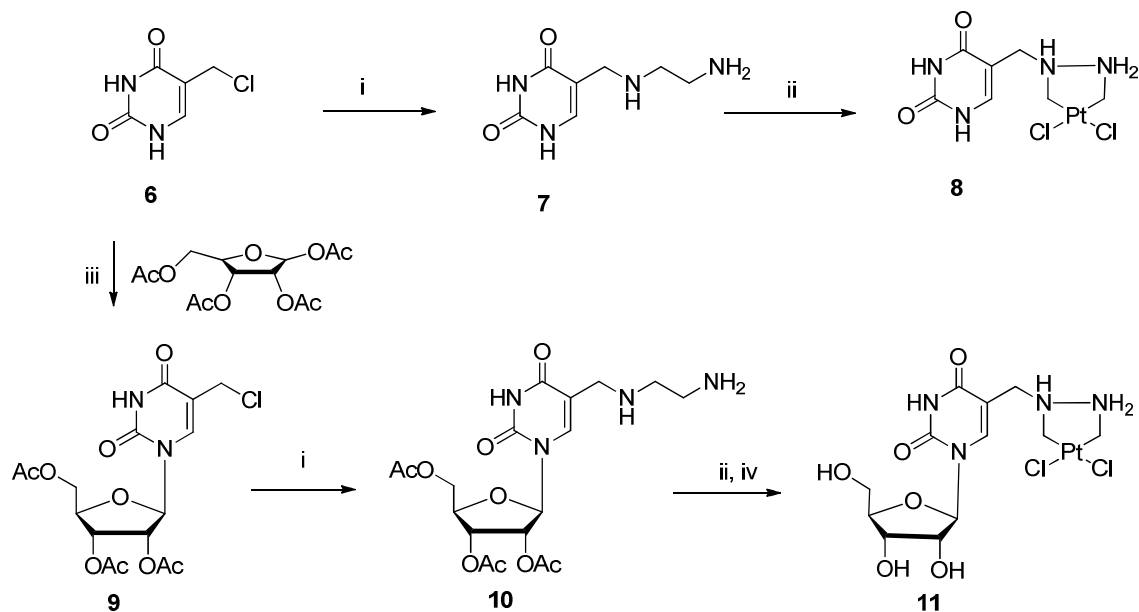
**Schéma 1.** Syntéza 5-(4-aminobutylaminomethyl)uracilu.

### 3.1.2. 5-(2-Aminoethylaminomethyl)uracil

Druhý známý diaminoalkyl derivát uracilu, aminoethylaminomethyl derivát **7** (*Schéma 2*), byl prvotně syntetizován jako meziprodukt syntézy *cis*-(1,2-diaminoethan) dichloroplatinatých komplexů připojených k uracilovému skeletu v poloze 5, jako potenciálních kancerostatických léčiv, resp. cisplatinových léčiv třetí generace.<sup>14</sup>

Podnětem syntézy těchto platinových derivátů byl předpoklad větší rozpustnosti a s tím související biodostupnosti a zároveň nižší toxicity v porovnání s používanou cisplatinou. Tento postup publikovaný autory v roce 1995 popisuje reakci 5-chloromethyluracilu **6** v přepočtu se 150-ti násobným nadbytkem suchého ethylendiaminu v methanolu. Připravený aminoethylaminomethyl derivát **7** byl smíchán s roztokem K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> v deionizované vodě, po dosažení pH 4 byl následně přidán vodný roztok KCl, čímž došlo k precipitaci platnatého komplexu **8** ve výtěžku 58% (*Schéma 2*). Při přípravě komplexů v nukleosidové řadě uridinů autoři opět vycházeli z 5-chloromethyluracilu **6**, který byl nejprve ribosylován klasickou silylovou metodou s 1,2,3,5-

tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranosou, HMDS, TMSCl a chloridem cíničitým jako Lewisovou kyselinou. Intermediát **9** analogickou reakcí s EDA poskytl diamino derivát **10** a následnou reakcí s  $K_2PtCl_4$  byl získán komplex platiny **11**.



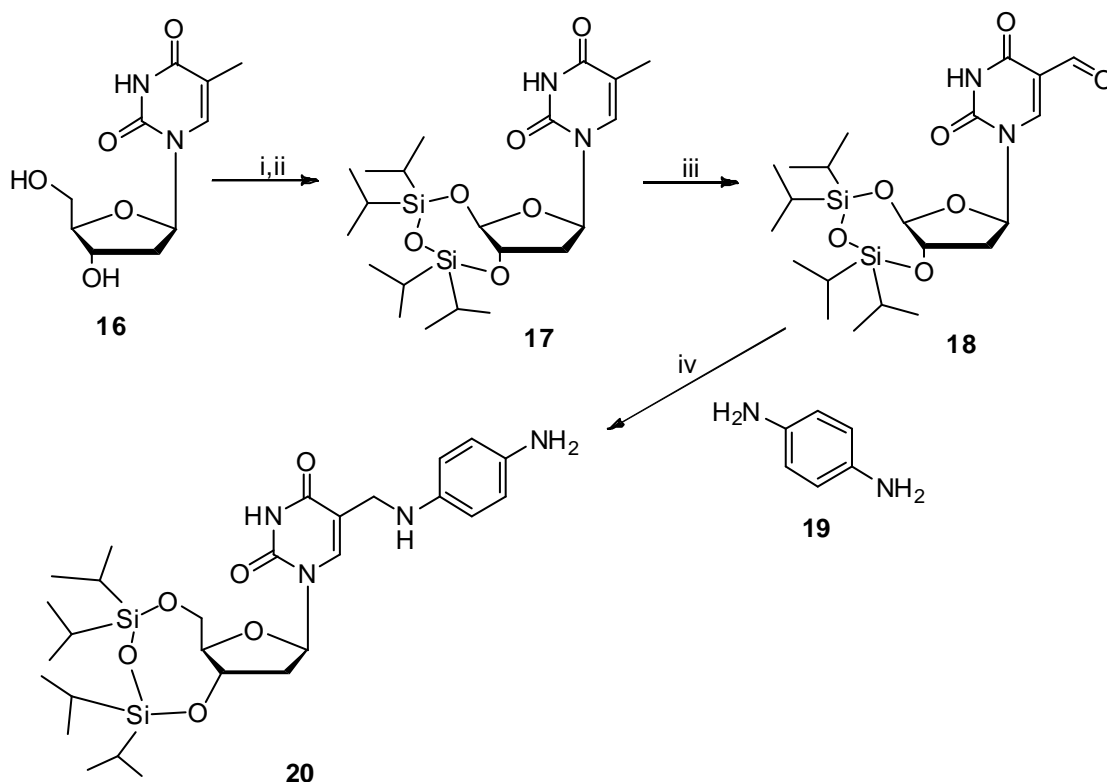
i) EDA, reflux; ii)  $K_2PtCl_4$ ,  $H_2O$ ,  $48^\circ C$ , 78h,  $N_2$ ; iii) HMDS, TMS-Cl,  $CH_3CN$ ,  $SnCl_4$ ; iv)  $CH_3ONa$ , DMSO

**Schéma 2.** Syntéza cis-(1,2-diaminoethan) dichloroplatnatých komplexů.

### 3.1.3. Analoga methyldiamino-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridinu

Několik dalších alifatických diamino derivátů bylo připraveno ve formě dideoxynukleosidů, kde byl výzkum zaměřen na syntézu potenciálních antivirových a kancerostatických preparátů, především nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy.<sup>15</sup> Výchozí sloučenina 5-hydroxymethyl derivát 2',3'-nenasyceného uridinu **12** byla konvertována na odpovídající 5-chloromethyl derivát uridinu **13**, který byl bez jakékoliv purifikace substituován odpovídajícím diaminem v ekvivalentním množství v dioxanu za přítomnosti diisopropylethylaminu. Takto připravené sloučeniny **14a-d** byly dle literatury nestabilní a hydrofobické, přičemž řešením této nestability bylo zavedení trifluoroctové skupiny na primární aminoskupinu diaminového zbytku reakcí s ethyl trifluoroacetátem v přítomnosti DMAP **15a-d**. Výtěžek daných reakcí se pohyboval okolo 65% (*Schéma 3*).





i) imidazol, DMF; ii) 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane, DCM; iii)  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 2,6-lutidin,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $65^\circ\text{C}$ , 4.5h; iv)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , DCM, RT, 24h

**Schéma 4.** Příprava 5-methylamino-2'-deoxyuridinů.

### 3.2 Biologická aktivita

Diaminoalkylderiváty zmíněné v rešeršní části této práce jsou předmětem četných studií zaměřených na biologické vlastnosti těchto sloučenin, především pak účinků antivirových či kancerostatických, jak je uvedeno v následující kapitole. Největší počet studií je pak zaměřen na již dříve zmíněný 5-(4-aminobutylaminomethyl)uracil **4** (označovaný také jako putrescinylthymine) v souvislosti s jeho přirozeným výskytem v DNA bakteriofágu  $\phi\text{W14}$ .<sup>17-25</sup>

#### 3.2.1. Cytotoxická aktivita platnatých komplexů diaminoalkyluracilů

U platnatých komplexů uracilu a uridinu **8** a **11** (Schéma 2) byla testována cytotoxická aktivita na třech typech buněčných linií.<sup>14</sup>

- (a) myší neoplastické lymfoidní buňky (P-388)
- (b) buňky karcinomu prsu u myší (FM-3A)
- (c) lidské buňky karcinomu močového měchýře (J-82)



Cytotoxický efekt byl studován za pomoci MTT testu, založeném na buněčné redukci ve vodě rozpustného MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) mitochondriální dehydrogenázou na nerozpustný modrý krystalický formazan a následném spektrofotometrickém měření. Připravené deriváty ovšem významnou cytotoxickou aktivitu nevykázaly. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 1.

**Tab. 1.** Cytotoxická aktivita platnatých komplexů.

komplex	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		
	FM-3A	P-388	J-82
8	28	17	20
11	34	27	13

SE 10% Vyhodnocení IC<sub>50</sub> bylo provedeno na základě třech nezávislých pokusů.

### 3.2.2. Antivirotická a cytotoxická aktivita analog C5 modifikovaných 2',3'-nenasycených uridinů

U připravených analog **15a-d** byla testována anti-HIV aktivita a cytotoxicita na linii lymfocytů CEM-SS a MT-4.<sup>15</sup> Připravené sloučeniny **15a** a **15c** nevykázaly žádnou antivirovou aktivitu, nicméně deriváty **15b** a **15d** s osmi a dvanácti methylenovými skupinami mezi aminoskupinami vykazovaly slabou antivirovou aktivitu v řadě CEM-SS buněk. Kromě celkově nižší antivirové aktivity u nich byla pozorována zvýšená cytotoxicita. Slabá antivirová aktivita byla přičítána jen slabé fosforylaci CEM-SS buňkami. Fosforylační proces 2',3'-dideoxynuklesidů je obecně pomalejší. Zavádění delších methylenových řetězců na C5 pozici uridinu vedlo obecně ke snížení anti-HIV aktivity (Tab.2). Uvedené koncentrace byly vyhodnoceny třemi nezávislými pokusy. Slabá schopnost fosforylovat uvedené sloučeniny vede výzkum k vývoji trifosfátů uvedených analogů.

**Tab. 2.** Antivirová a cytotoxická aktivita 2',3'-nenasycených uridinů.

sloučenina	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	CEM-SS linie		MT-4 linie	
		IC <sub>50</sub> (μM)*	CC <sub>50</sub> (μM)**	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
d4T					
15a	n = 6	> 100	> 100	> 100	> 100
15b	n = 8	7.4	18	100	12
15c	n = 10	~100	>100	>100	>100
15d	n = 12	2.8	12	>100	16

\*IC<sub>50</sub> koncentrace nutná k 50% inhibici multiplikace HIV-1

\*\*CC<sub>50</sub> koncentrace působící cytotoxicky u 50% neinfikovaných buněk

### 3.2.3. Biologické studie putrescinylthyminu

DNA několika skupin bakteriofágů obsahuje větší množství modifikovaných bází v alternujícím množství. Přítomnost modifikovaných bází ovlivňuje některé fyzikální vlastnosti DNA, navíc mohou tyto báze nést další substituenty, např. glukózu či amin.

Jednou z těchto modifikovaných bází je i putrescinylthymin **4**, objevený v DNA bakteriofágu  $\phi$ W14, která je prvním známým případem přírodní nukleové kyseliny s kovalentně vázaným polyaminem. Jeho objevení podnítilo rozsáhlé studie zabývající se chemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou putThy. Výsledkem těchto studií bylo například zjištění, že putrescinylová skupina nepodléhá další substituci, na rozdíl od výše zmíněných.<sup>12</sup> Některé studie také odhalily zvýšenou rezistenci DNA obsahující putThy vůči nukleázám, ale také zvýšenou bazickou labilitu.<sup>18,18</sup>

Ze studií sledujících vliv substituce methylové skupiny thyminu dále vyplynulo, že polární či alkylové substituenty destabilizují DNA, což bylo dokázáno právě u putrescinylové skupiny.<sup>19</sup> Její přítomnost se projevuje velmi malou vznášivou hustotou DNA, pravděpodobně díky methylenovým skupinám ve vedlejších řetězci, které mají přímý efekt na hustotu, jelikož exkludují Cs<sup>+</sup> ionty při isopyknické centrifugaci.<sup>19</sup> Vlastnosti DNA bakteriofágu  $\phi$ W14 vypovídají o iontové vazbě mezi aminem putrescinylskupiny a fosfátem, které mají na stabilizaci DNA markantnější vliv než vodíkové vazby, jelikož amino skupina neutralizuje negativně nabitě fosfátové zbytky. To se projevuje právě neobvykle vysokou T<sub>m</sub>, zvýšenou o celých 9°. <sup>19</sup> Tento kladný vliv byl potvrzen acetylací, která T<sub>m</sub> DNA opět snížila.<sup>23</sup> Primární i sekundární aminoskupina putThy neutralizací repulzí negativních nábojů v DNA dovolují také velmi těsné svinutí DNA ve virionu.<sup>19</sup>

Modifikované báze mohou ovlivňovat stupeň hydratace nukleové kyseliny. Úseky DNA řetězce bohaté na A:T váží až dvakrát více molekul vody než úseky G:C, což je přičítáno i hydrofobní methylové skupině thyminu. Přítomnost této methylové skupiny ve velkém žlábků podporuje agregaci vody, čímž zvyšuje napětí ve velkém žlábků a udržuje ho více rozevřený. Proto DNA bohatá na seskupení A:T má tendenci zaujmout právě B konformaci se širokým velkým žlábkem. Hydrofilní linker namísto hydrofobního proto silně ovlivňuje hydrataci DNA a tím i strukturu. Zdá se, že přítomnost putThy předurčuje stabilizaci DNA v A formě, jelikož v tomto svinutí je usnadněna tvorba iontových vazeb mezi aminoskupinou putThy a fosfátem.<sup>19</sup>

Při charakterizaci chemických vlastností putThy byla reaktivita primární aminoskupiny testována dvěma činidly: 2,4,6-trinitrobenzensulfonátem (TNBS) a acetanhydridem. Primární aminoskupina putThy reagovala s TNBS signifikantně a současně úměrně množství DNA, reaktivita sekundární aminoskupiny byla

zanedbatelná.<sup>23</sup> Stupeň reakce DNA s TNBS při pH 9.5 byl za pokojové teploty určen měřením absorpance sulfitových komplexů TNP amino skupin při pH 6.0. Naproti tomu acetanhydrid acetyluje primární i sekundární amino skupiny, je proto možné očekávat směs mono- i diacetylovaného produktu. Acetylace putThy je funkcí pH a koncentrace soli.<sup>23</sup>

Studie sledující vliv modifikovaných DNA bakteriofágu na vychytávání homologní DNA buňkami *Bacillus subtilis* ukázala, že DNA bakteriofágu  $\phi$ W14 snižuje frekvenci transformace osmkrát.<sup>18</sup> Tento efekt nebyl pozorován u heterologní DNA s ionicky vázaným putrescinem. Ionicky vázaný putrescin se totiž váže do malého žlábků DNA šroubovice na rozdíl od kovalentně vázaného putrescinu, který se nalézá ve velkém žlábků. Možným vysvětlením je inhibice některého intracelulárního procesu zahrnutého v transformačním procesu. DNA bakteriofágu je mnohem úspěšnější díky schopnosti vázat se kromě receptorů transformující DNA i na jiná místa na buněčném povrchu.

Řetězec putrescinu je obdobou koncového řetězce lysinu, s výjimkou sekundární aminoskupiny. Přítomnost aminoskupin je navíc výhodná z hlediska možné modifikace, která by umožnila např. studium konformací DNA v roztoku; vlivu pozitivního náboje na stabilitu; či možnosti připojení DNA řetězce kovalentně k polymernímu nosiči a využití v afinitní chromatografii.

### **Přirozený výskyt $\alpha$ -putrescinylthyminu**

Thymin i putThy **4** jsou formovány z výchozího 5-hydroxymethyluracilu **1** (hmUra) na úrovni polynukleotidů, přičemž bylo prokázáno, že thymin není prekurzorem putThy.<sup>20</sup> Z tohoto zjištění vyplývá, že DNA bakteriofágu podstupuje dvě post-polymerizační modifikace, první formující thymin a druhá putThy, přičemž každá zahrnuje okolo 12% bází v DNA. Mononukleotidy putThy nejsou detekovatelné v infikovaných buňkách, tím se potvrdilo zjištění, že putThy je syntetizován na polynukleotidové úrovni.<sup>20</sup>

Studie výskytu putThy také ukázaly, že distribuce putThy v DNA není nahodilá a je nerovnoměrná. Sekvence purin-putThy-purin se vyskytuje v DNA dvakrát častěji než odpovídající sekvence purin-thymin-purin.<sup>20</sup>

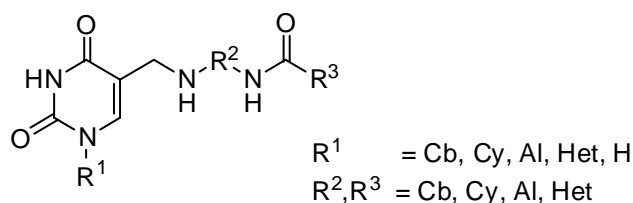
Vychytávání putrescinu přirozeným hostitelem bakteriofágu  $\phi$ W14 *Pseudomonas acidovorans* a následná inkorporace putrescinu do DNA *P. acidovorans*  $\phi$ W14 je závislá na pH. Za normálních podmínek nedostatek aktivního transportu chrání *P. acidovorans* před vychytáváním putrescinu. Při pH 9.5 však do buňky proniká. Při změně pH zpět na 7.0 dochází k jeho konverzi na 2-hydroxyputrescin a spermidin.<sup>24</sup>

Modifikovaná báze je stále předmětem výzkumu, pokud totiž formování putThy je determinováno určitou sekvencí, pak všechen nemodifikovaný 5-hmUra může být

konvertován na thymin nespecificky či *vice versa*.<sup>20</sup>

### 3.3. Metody přípravy vedoucí ke známým karboxamidovým derivátům uracilu

Následující kapitola je zaměřena na studium karboxamidových modifikací přírodních nukleobází, z nichž byla největší pozornost v rámci bakalářské práce věnována skupině látek prezentovaných na *Obr. 5*. Komerčně snadno dostupné symetrické diaminy jsou široce využívány nejen jako linkery v solid-phase syntéze, ale též jako prekurzory karboxamidů využívaných při studiu chemie povrchů, biokonjugátů či medicíně. <sup>26</sup>



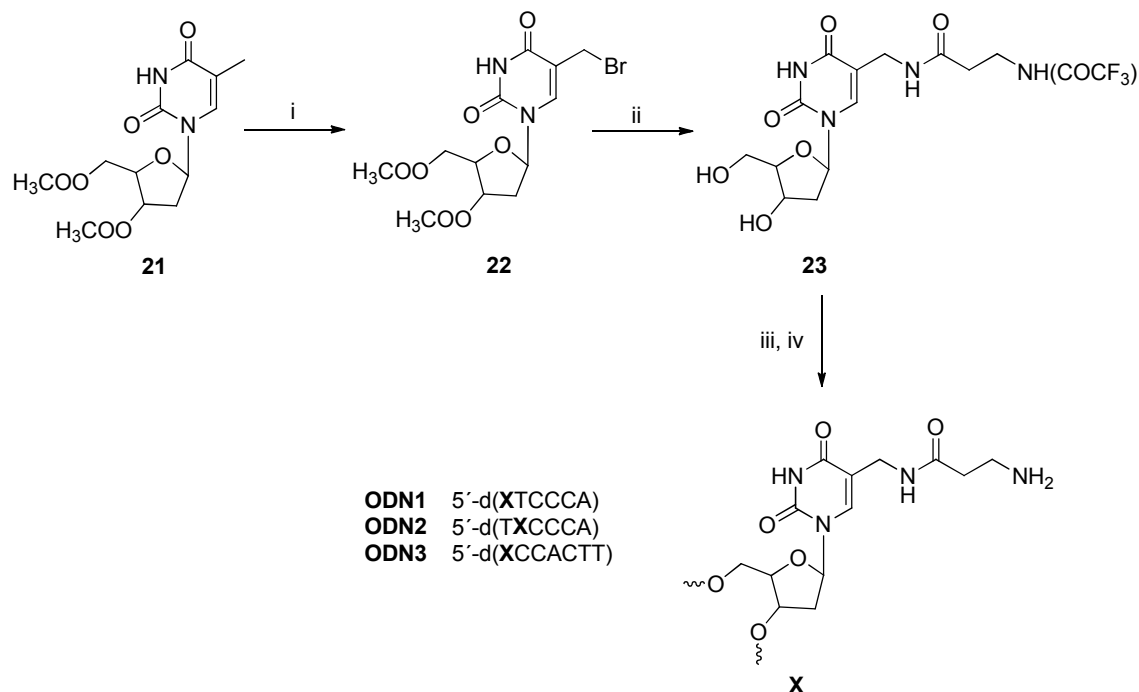
**Obr. 5.** Struktura zkoumaných karboxamidových derivátů.

Evidentně největší pozornost je věnována oblasti výzkumu syntetických modifikovaných oligodeoxynukleotidů (dále jen ODN). C5 modifikované deoxyuridiny byly jedny z prvních modifikovaných nukleotidů připravovaných cíleně pro oligodeoxynukleotidovou syntézu. ODN s variabilními linkery i reaktivními skupinami jsou hojně používány v molekulární biologii, biotechnologiích a medicíně. Můžeme jmenovat deriváty s fluorescenčními značkami, biotinem či komplexy kovů. Běžně je zaváděna reaktivní skupina i na 5' koncovou pozici fosfátu. Tyto modifikace nezasahují do formování duplexu, přesněji řečeno nejsou začleněny do duplexu přímo. Naproti tomu modifikace C5 pozice nukleobáze má přímý vliv na komplementární vlákno, formování duplexu. Kromě toho je koncová 5' skupina fosfátu stále volná pro připojení dalších skupin.

#### 3.3.1 Syntéza oligonukleotidů s karboxamidovou modifikací uracilu

Možnosti využití syntetických oligodeoxynukleotidů s modifikovanou bází již byly v tomto textu zmíněny. Tyto ODN mohou být syntetizovány jednak inkorporací modifikovaného nukleotidu do ODN nebo dalšími modifikacemi ODN na tzv. post-syntetické úrovni. Obě tyto metody byly využity při syntéze **ODN1-3** obsahujících

monomer **X** s reaktivní aminoskupinou (Schéma 5.), která může být dále post-synteticky modifikována fotoreaktivní, alkylační nebo interkalační skupinou, přičemž je sledován vliv takovéto substituce na stabilitu DNA duplexu.<sup>27</sup>



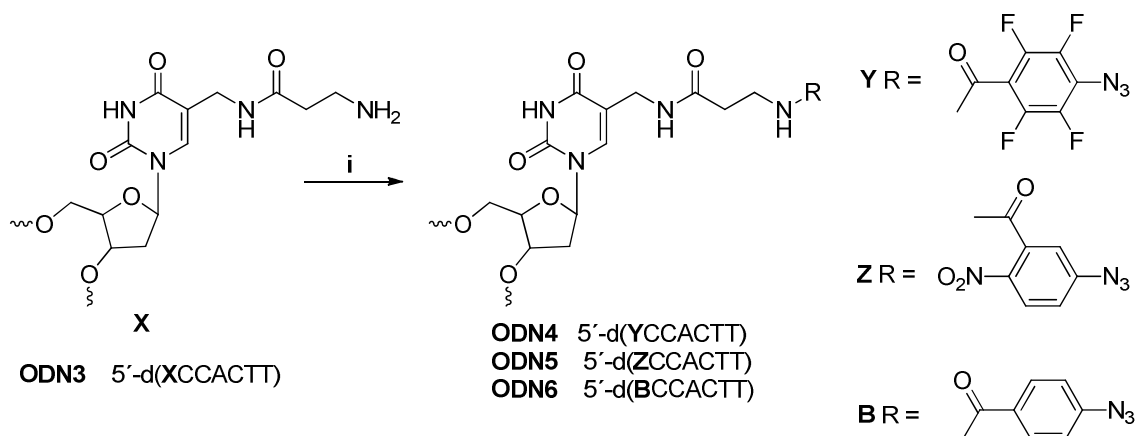
i) Br<sub>2</sub>; ii) NH<sub>4</sub>OH; DMF, TFA-β-Ala-OSuc, 2h, RT; iii) DMTrCl, PCl<sub>3</sub>, imidazol; H<sub>2</sub>O;  
iv) CPG-500, coupling, CF<sub>3</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pivaloyl chlorid

**Schéma 5.** Syntéza oligonukleotidů s karboxamidovou modifikací.

Autoři v citovaném článku navrhli jednoduchou metodu přípravy zmíněných oligodeoxynukleotidů **ODN1-3** vycházející z 5',3'-diacetylthymidinu **21** (Schéma 5.). Tento derivát **21** byl nejdříve bromován za vzniku 5',3'-diacetyl-5-(bromomethyl)deoxyuridinu **22**, aminován NH<sub>4</sub>OH a následně reagován s esterem *N*-hydroxysuccinimid(trifluoracetyl)-β-alaninu za tvorby chráněného nukleosidu **23**. Trifluoroacetylovaný nukleosid **23** byl standardní fosfonátovou metodou, která spočívala v tritylaci 5'-hydroxylové skupiny s následnou reakcí 3'-hydroxylové skupiny s PCl<sub>3</sub> a imidazolem, inkorporován do oligonukleotidů **ODN1-3**.

Oligodeoxynukleotidy **ODN1-3** nesoucí reaktivní aminoskupinu je možné dále modifikovat připojením fotoreaktivní, alkylační nebo interkalační skupiny za účelem studia termické stability modifikovaného duplexu.

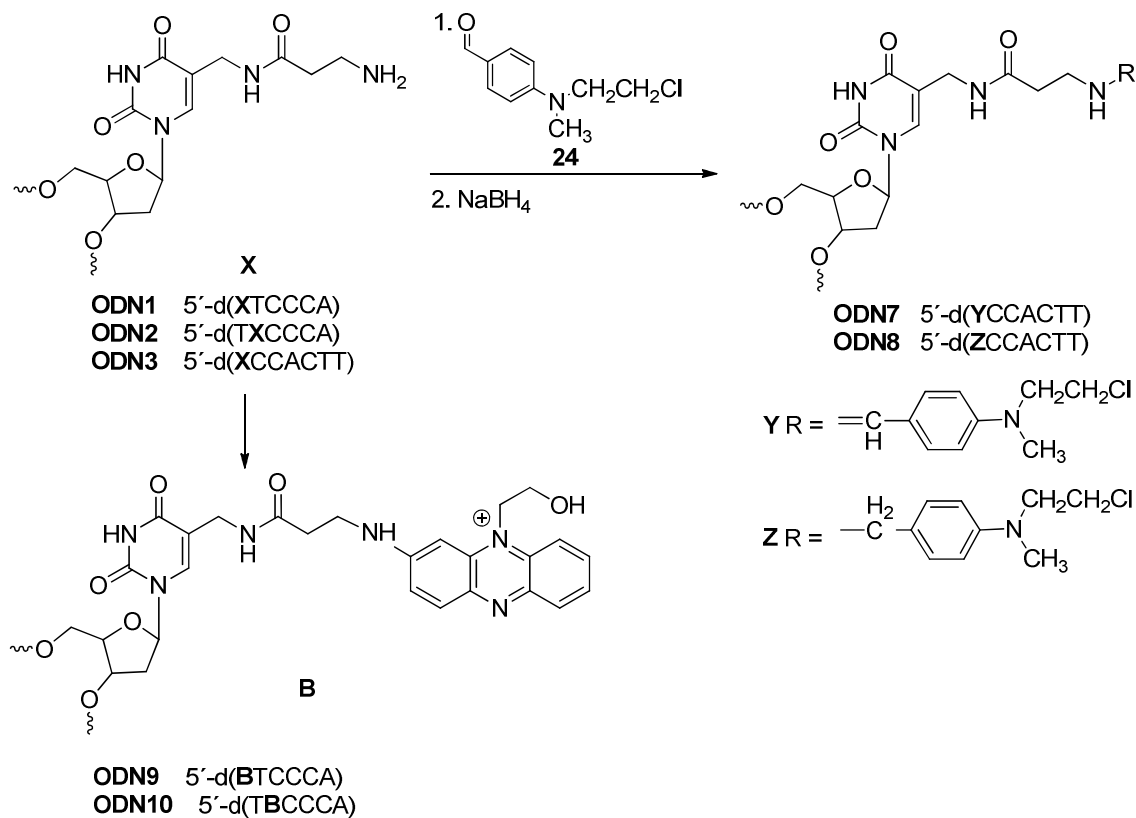
Fotoreaktivní arylazido modifikované oligonukleotidy **ODN4-6** byly připraveny post-syntetickou reakcí heptanukleotidu **ODN3** s estery odpovídajících azidobenzoových kyselin v DMF (Schéma 6).



i) DMF, N-hydroxysukcinimid ester of corresponding azidobenzoic acids R, 2% LiClO<sub>4</sub>/acetone

### Schéma 6. Syntéza fotoreaktivních arylazido derivátů.

Oligonukleotidy **ODN7-8** obsahující alkylační 4-*N*-(2-chloroethyl)-*N*-methylaminobenzyl skupinu byly opět syntetizovány z heptanukleotidu **ODN3**, a to reakcí s 4-[*N*-(2-chloroethyl)-*N*-methylaminobenzaldehydem **24** a následnou redukcí Schiffovy báze borohydridem sodným (Schéma 7).



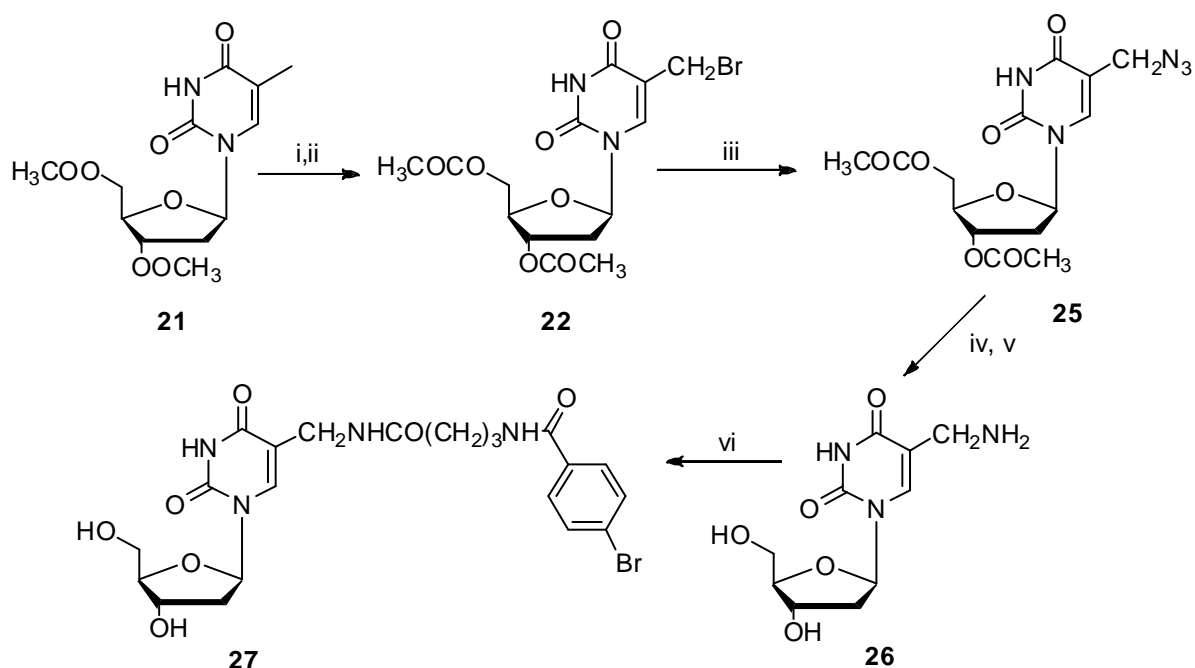
### Schéma 7. Syntéza oligonukleotidů s alkylačním substituentem.

Oligonukleotidy **ODN9-10** s interkalační *N*-(2-hydroxyethyl)phenazinium skupinou byly připraveny reakcí **ODN1-2** s *N*-(2-hydroxyethyl)phenazinium chloridem (Schéma 7).

Všechny připravené ODN byly izolovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reversní fázi v 70-80% výtěžku fotoreaktivních derivátů **ODN4-6**, 20-50% výtěžku alkylačních derivátů **ODN7-8** a 80-90% výtěžku interkalačních derivátů **ODN9-10**. Finální hybridizační experimenty ukázaly, že modifikace alkylačním zbytkem nemá na  $T_m$  duplexu žádný vliv, naproti tomu fotoreaktivní a interkalační skupiny tuto  $T_m$  mírně zvyšují.

### 3.3.2 Analoga thymidinu pro neradioaktivní nukleosidové značení DNA

Následující kapitola popisuje syntetickou cestu vedoucí k derivátu deoxyuridinu obsahující bromofenylskupinu jako imunochemickou značku (Schéma 8).



i)  $(CH_3CO)_2O$ , pyridin; ii)  $Br_2$ ,  $CCl_4$ ; iii)  $NaN_3$ ,  $CH_3CN$ ; iv)  $NH_3$ ,  $CH_3OH$ ; v)  $Ph_3P$ ,  $THF.H_2O$

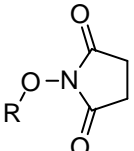
vi) , DMF R = p-BrPhCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CO

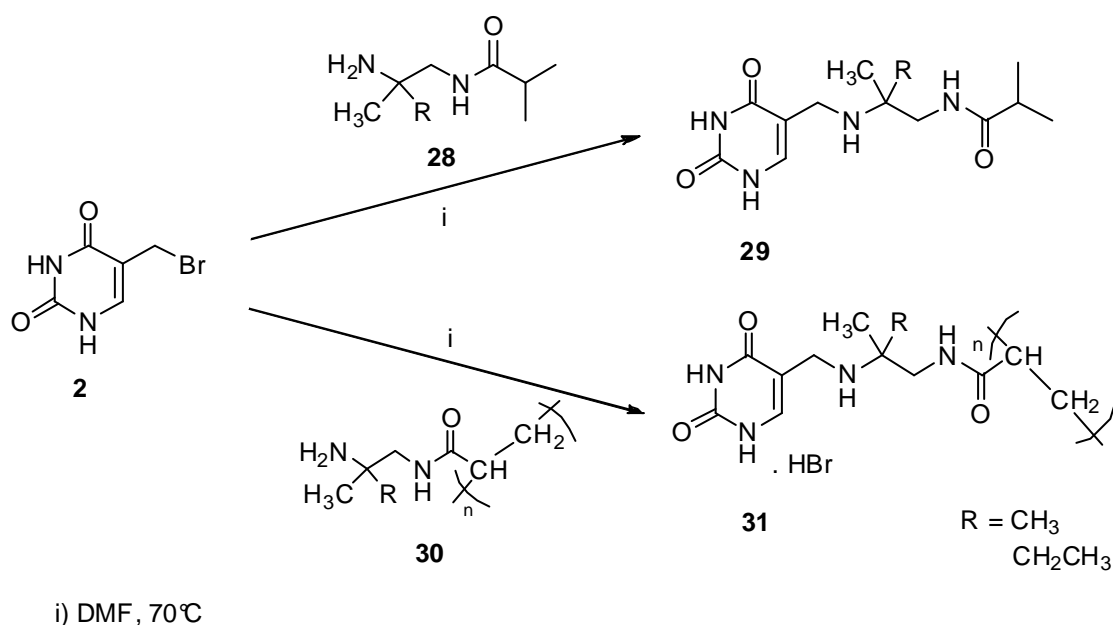
Schéma 8. Syntéza analogu thymidinu.

Imunochemické značky určené pro *in vivo* značení DNA bylo běžné zavádět na nukleosidovou bázi, avšak nebylo běžné je zavádět na methylovou skupinu thymidinu, jak je popsáno autory níže.<sup>28</sup>

Acetylovaný deoxythymidin **21** byl modifikován na 5-bromodeoxyuridinový derivát **22**. Následnou substitucí bromu azidem sodným byl připraven azid **25**, jeho redukcí podle Knouziho<sup>29</sup> (užitím PPh<sub>3</sub> v přítomnosti vody) byl připraven 5-aminomethyldeoxyuridin **26** a následně reakcí s 6-(bromobenzoylamino)kapronovou kyselinou *N*-hydroxysukcinimidu derivát **27** (Schéma 8).

### 3.3.3 Syntéza polyakrylamidů uracilu

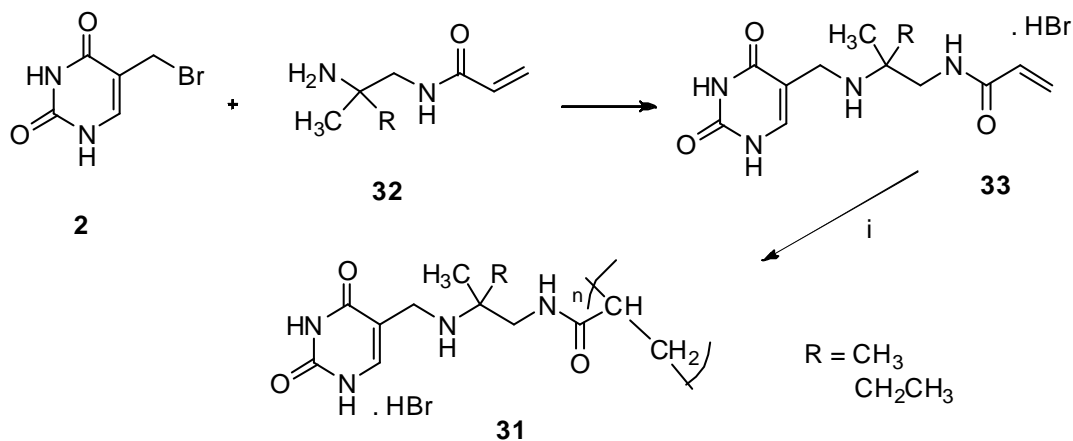
Poslední publikace týkající se zadané struktury obsahující karboxamidovou modifikaci v poloze 5 uracilového skeletu popisuje syntézu monomerních a polymerních akrylamidů nesoucí přes aminoskupinu připojenou nukleovou bázi uracil (Schéma 9).<sup>30</sup> Výchozí 5-bromomethyluracil derivát **2** reaguje s ekvivalentním množstvím monomeru **28** či polymeru **30** akrylamidu v DMF (Schéma 9). Monomerní produkt **29** byl získán parciální precipitací z methanolu s přidavkem ethylacetátu ve formě hydrobromidu v 75% výtěžku, polymerní produkt **31** pak byl izolován iontově výměnnou chromatografií ve výtěžku 88%.



**Schéma 9.** Syntéza monomerních a polymerních akrylamidových derivátů.



Alternativní postup za účelem zvýšení výtěžku popisuje reakci monoakrylamidových sloučenin **32** s bromomethyl derivátem uracilu **2** a následnou polymerizací 100% uracilem pokrytých monomerů metodou volných radikálů s 84% výtěžkem (Schéma 10).



i) AIBN/MeOH

**Schéma 10.** Syntéza monomerních derivátů s následnou polymerací.

U připravených polyakrylamidů **31** byla ve směsi polymer-polymer studována stabilita helikálních komplexů vznikajících párováním komplementárních bází. Vzniklé komplexy sestávající z polyakrylamidů uracilu s komplementárními polyakrylamidy adeninu však vykazovaly stabilitu pouze v neutrálním prostředí. Alkalické či acidické prostředí stabilitu vlivem elektrostatických repulzí výrazně snižovalo.

## 4. Diskuze a výsledky

Jak již bylo zmíněno v úvodu, cílem této bakalářské práce bylo připravit deriváty uracilu **35** nesoucí v poloze 5 methylovým můstkem navázaný alifatický či aromatický diamin s variabilním linkerem mezi dvěma aminoskupinami. Primární aminová funkce měla být následně substituována karboxylovými kyselinami či jejich funkčními deriváty za tvorby amidové vazby a vzniku odpovídajících analog **36**. V případě úspěšné syntézy C5 substituovaných analog uracilu může být tato práce dále rozšířena na enantioselektivní přípravu acyklických nukleosidů **38** a **39** a to reakcí připravených diaminů **35** či karboxamidů **36** s (*R*)-(+)-glycidolem **37** (Schéma 11).

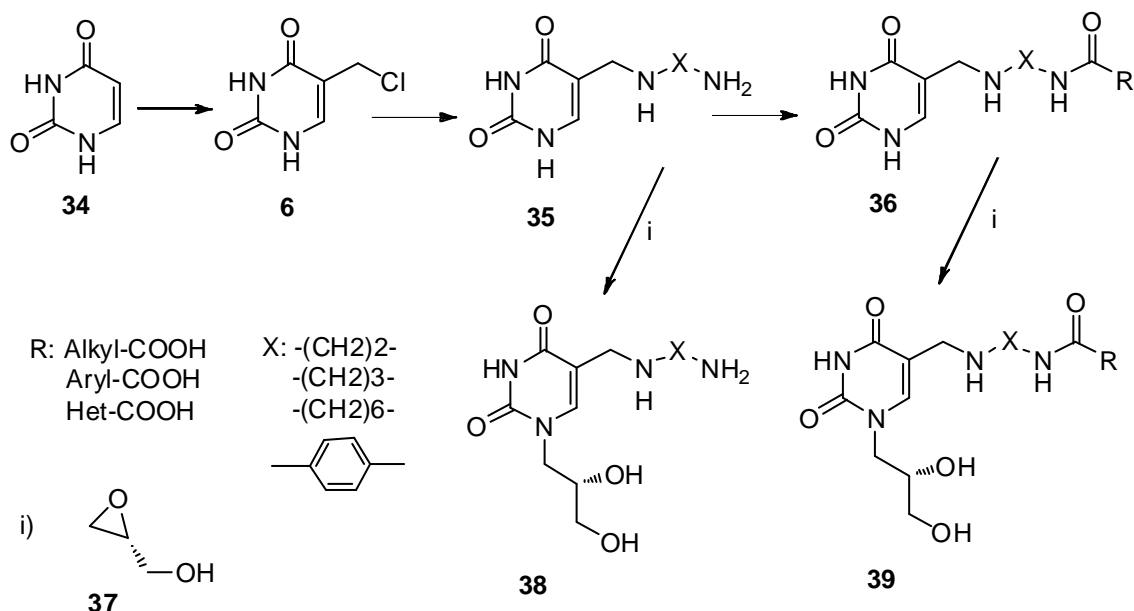
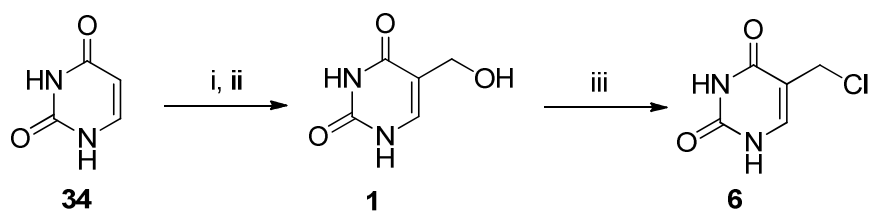


Schéma 11. Navržená strategie syntézy cílových derivátů.

### 4.1. Příprava výchozího 5-chloromethyluracilu

Výchozí látkou pro navrženou syntézu byl 5-chloromethyluracil **6** připravený z odpovídajícího hydroxy derivátu **1** (Schéma 12).



i) (HCHO)<sub>n</sub>, Ba(OH)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, reflux ii) HCl/H<sub>2</sub>O

iii) konc.HCl, RT, 2h

**Schéma 12.** Syntéza intermediátu 5-chloromethyluracilu.

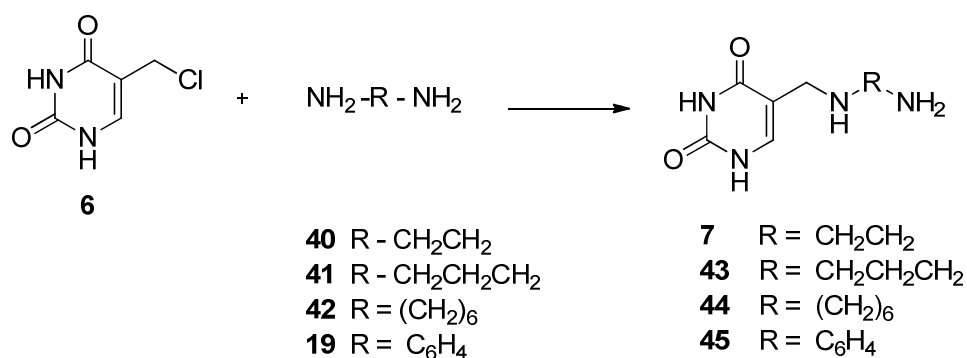
Literatura popisuje několik metod přípravy prekursoru 5-hydroxymethyluracilu **1** počínaje oxidací thyminu peroxidisulfátem sodným ve vodě při 85 °C, redukcí 5-formyluracilu za katalýzy Pd či PdO/BaSO<sub>4</sub> či reakce formaldehydu případně paraformaldehydu s uracilem ve vodném roztoku za bazické katalýzy.<sup>31</sup> Nevýhodami prvně zmíněných metod byly drastické reakční podmínky a potřeba finančně nákladné katalýzy kovem. Oproti tomu reakce uracilu **34** s paraformaldehydem za vhodné bazické katalýzy poskytuje vysoké výtěžky. Bazickým katalyzátorem může být např. KOH nebo Ba(OH)<sub>2</sub>. Katalýza KOH při teplotě 50 °C s molárním poměrem uracil/(HCHO)<sub>n</sub> 1:1.2 se ukázala být nejvhodnější. Po odreagování je reakční směs okyselena 2M HCl na pH 7, precipitát je rekrystalován z acetonu a vody. 5-Hydroxymethylenuracil **1** byl s ohledem na nejvhodnější podmínky připraven právě třetí zmiňovanou metodou reakcí uracilu s paraformaldehydem za katalýzy Ba(OH)<sub>2</sub> ve výtěžku 63%.<sup>31</sup>

5-Hydroxymethyluracil **1** byl v dalším kroku převeden na 5-chloromethyluracil **6** reakcí v roztoku koncentrované kyseliny chlorovodíkové za laboratorní teploty po dobu dvou hodin, produkt byl zfiltrován a promyt HCl (*Schéma 12*).<sup>32</sup> Tato metoda má téměř kvantitativní průběh (90%) oproti dříve popisovaným chloromethylacím uracilu trioxymethylenem v konc. HCl při 80 °C (57%) či zahříváním hydroxymethyl derivátu s HCl (37%). Chlor derivát byl v rámci této bakalářské práce připraven v 64% výtěžku, ke ztrátám produktu došlo při izolaci. Přestože byl tento derivát v literatuře charakterizován z hlediska fyzikálních i spektrálních vlastností,<sup>33</sup> je charakterizace této látky rovněž zahrnuta v experimentální části práce, protože některé údaje (1H NMR spektrum<sup>33</sup> a m.p.<sup>34,35</sup>) byly mírně odlišné, zvláště v porovnání se starší literaturou.

## 4.2. Příprava aminoalkyl/arylaminomethyluracilů a jejich izolace

Klíčovým krokem v celkovém reakčním schématu byla substituce chloru výchozího 5-chloromethyluracilu **6** variabilními diaminy (*Schéma 13*), přičemž byly zvoleny

alifatické ethylendiamin **40**, propylendiamin **41**, hexylendiamin **42** a aromatický *p*-fenylendiamin **19**.



**Schéma 13.** Obecný postup syntézy diamino derivátů.

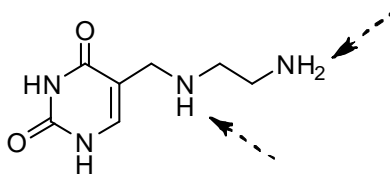
Za tímto účelem bylo vypracováno a vyzkoušeno několik reakčních postupů odvíjejících se od již v literatuře popsanych výsledků, které jsou shrnuty následovně:

- 1) Reakce chlor derivátu **6** s nadbytkem diaminu v MeOH
- 2) Reakce chlor derivátu **6** s 2 ekvivalenty diaminu ve vřoucí acetonu
- 3) Reakce chlor derivátu **6** s ekvivalentem diaminu ve vřoucí acetonu s přidavkem TEA
- 4) Reakce chlor derivátu **6** s ekvivalentem diaminu v DMF s přidavkem TEA
- 5) Reakce chlor derivátu **6** s 2–2.5 ekvivalenty diaminu v suchém 1,4-dioxanu

### **Syntéza s nadbytkem diaminu v MeOH**

První ze zmiňovaných přístupů k syntéze požadovaných diamino derivátů byl zvolen podle výsledků popsanych již v roce 1998 pro ethylendiaminový derivát **7**.<sup>14</sup> Tato metoda spočívala v reakci chlor derivátu **6** se 150-ti násobným přebytkem ethylendiaminu **40** v methanolu při teplotě 75 °C po dobu 48 hodin. Při pokusu o reprodukci uvedeného postupu se však tato metoda ukázala neschůdná. Vyšší teplota a dlouhá reakční doba vedly ke vzniku směsi produktů, ve které se vždy nacházela požadovaná látka a disubstituovaný produkt, který byl identifikován na základě MS analýzy. Nicméně vzhledem k velice podobným vlastnostem a polaritě obou látek se nepodařilo tuto směs rozseparovat. Jelikož se zmíněný disubstituovaný produkt nepodařilo izolovat, nebylo ani možné určit další místo zásahu chlor derivátu **6**. Lze jen předpokládat možná místa dalšího ataku, která jsou navržena na *Obr. 6*. Při pokusu o

zkrácení reakční doby zvýšením teploty na 85 °C opět docházelo ke vzniku směsi látek. Všechny uvedené reakční podmínky jsou přehledně shrnuty v *Tab. 3*.



**Obr. 6.** Možné pozice disubstituce aminoethylaminomethyl derivátu.

**Tab. 3.** Přehled reakčních podmínek syntézy derivátu **7**.

derivát	reakce	diamin	t (°C)	τ (h)	LC-MS
7	1	EDA	75	48	MSd + DSd
	2	EDA	85	8	MSd + DSd
	3	EDA	85	27	MSd + DSd

MSd = monosubstituovaný derivát, DSd = disubstituovaný derivát

### **Syntéza s 2 ekvivalentem diaminu ve vroucím acetonu**

Po neúspěšné reprodukci popsaného postupu byly hledány další podmínky, které by vedly k syntéze požadovaných intermediátů. V alternativním postupu byly k výchozímu 5-chloromethylenuracilu **6** přidávány diaminy ve dvouekvivalentním množství v prostředí horkého acetonu.<sup>36</sup> Nejdříve byly připraveny roztoky diaminů **19**, **40-42** v horkém acetonu a suspenze chlor derivátu **6** v horkém acetonu a následně roztoky diaminů **19**, **40-42** pomalu přikapávány do suspenze derivátu **6**. Po smíchání těchto dvou reagentů byla vzniklá směs refluxována po dobu 2-6 hodin (*Tab. 4*). Po odreagování byl produkt zfiltrován a promyt horkým acetonem, vysušen pod UV lampou a následně rekrystalován z MeOH.

Přehled všech reakčních podmínek pro jednotlivé prekurzory je uveden v *Tab. 4*. Z této tabulky je patrné, že reakční doba se odvíjela od zvoleného diaminu, kdy bylo třeba zohlednit různou nukleofilitu aminové skupiny. Reakce poskytovaly surové produkty ve výtěžcích uvedených v *Tab. 4*. Z tabulky také vyplývá, že klíčovou reakční dobu při přípravě derivátu **7** představovaly 3 hodiny, kdy se výtěžek surového produktu značně zvýšil. Tato tabulka také uvádí výstupy z LC-MS, ze kterých je patrné, že téměř ve všech případech dochází ke vzniku směsi mono- a disubstituovaných látek. Z výstupů analýzy LC-MS uvedených v tabulce je patrná odlišná, již dříve zmíněná reaktivita primární i sekundární aminoskupiny u alifatických a aromatických diaminů. Je zřejmé, že v případě *p*-fenylendiaminu jsou volné elektronové páry aminoskupin v

konjugaci s aromatickým jádrem, což přispívá ke snížení bazicity, tedy reaktivity aminoskupiny. Proto v případě derivátu **45** nebyl pozorován vznik dvojnásobně substituovaného derivátu a látka byla izolována v čisté podobě ve formě amonné soli.

**Tab. 4.** Přehled reakčních podmínek přípravy diaminoderivátů v acetonu.

derivát	reakce	diamin	t (°C)	τ (h)	výtěžek (%)	LC-MS
<b>7</b>	1	EDA	60	2	45	VL + MSd
	2	EDA	60	3	78	MSd + DSd
	3	EDA	60	3.5	77	MSd + DSd
	4	EDA	60	4	75	MSd + DSd
	5	EDA	60	5	77	MSd + DSd
<b>43</b>	1	PDA	60	2.5	50	MSd + DSd
	2	PDA	60	3.5	84	MSd + DSd
	3	PDA	60	4.5	68	MSd + DSd
	4	HDA	60	4.5	89	MSd + DSd
<b>44</b>	1	HDA	60	5.5	31	MSd + DSd
	2	HDA	60	6	47	MSd + DSd
<b>45</b>	1	PhDA	60	5	67	MSd
	2	PhDA	60	6	90	MSd

MSd= monosubstituovaný derivát, DSd = disubstituovaný derivát, VL = výchozí látka

Touto metodou může pravděpodobně vznikat sůl diaminomethyl derivátu uracilu i sůl použitého diaminu v závislosti na množství přidané báze a ztěžovat tak konečnou izolaci produktu. Tato skutečnost by odpovídala i neochotě připravených látek rozpouštět se v methanolu. Značná polarita odpovídala i minimálním hodnotám  $R_f$ . Snahou bylo vzniklé soli separovat rozpuštěním produktu v 5% roztoku  $K_2CO_3$ , předpokládalo se, že uvolněný diamin zůstane v roztoku, zatímco dojde k vysrážení derivátu uracilu. Ke vzniku sraženiny však nedošlo, neboť zřejmě uracilový derivát přešel na draselnou sůl, proto bylo následně pH upravováno 5%  $CH_3COOH$ . Touto neutralizací a následným ochlazením na 5 °C nakonec došlo po několika dnech k uvolnění precipitátu. Nicméně LC-MS i NMR analýza potvrdila u všech alifatických derivátů přítomnost dvojnásobně alkylovaného produktu.

### **Syntéza s ekvivalentem diaminu ve vroucím acetonu s přidavkem TEA**

Vzhledem k předpokládanému vzniku solí vzniklých diaminových derivátů byly reakční podmínky upraveny tak, aby byla tvorba solí minimalizována. V reakci byl použit ekvivalent diaminu s 2.5 násobným nadbytkem triethylaminu, přidané báze

vázající uvolňovaný chlorovodík. Reakce opět probíhaly ve vřoucí acetonu (*Tab. 5*). *Tab. 5* uvádí surové výtěžky získaných látek ve srovnání s výtěžky poskytnutými předchozí reakcí derivátu **6** s dvouekvivalentním množstvím diaminu. Ani v tomto případě analýzy LC-MS a NMR nepotvrdily vznik čistých produktů, ve většině reakcí se vždy objevovalo určité množství disubstituovaného produktu. Opět pouze v případě aromatického diamino derivátu **45** není ve spektrech LC-MS disubstituovaný derivát patrný, vzhledem k již dříve diskutované nižší bazicitě aminoskupin.

**Tab. 5.** Přehled reakčních podmínek reakce diamino derivátů v acetonu s přidavkem báze.

derivát	diamin	množství diaminu	TEA	t (h)	výtěžek (%)	LC-MS
7	EDA	1 eq	2.5 eq	2	54	MSd + DSd
	EDA	2 eq	-	2-4	45-78	MSd + DSd
43	PDA	1 eq	2.5 eq	3	48	MSd + DSd
	PDA	2 eq	-	3	50-89	MSd + DSd
44	HDA	1 eq	2.5 eq	6	77	MSd + DSd
	HDA	2 eq	-	4-5	89	MSd + DSd
45	PhDA	1 eq	2.5 eq	6	55	MSd
	PhDA	2 eq	-	4-5	52	MSd

MSd= monosubstituovaný derivát, DSd = disubstituovaný derivát, VL = výchozí látka

Další přístup k syntéze požadovaných diamino derivátů byl založen na využití výchozího kapalného diaminu jako rozpouštědla. Chlor derivát **6** byl v tomto případě smíchán s vysokým nadbytkem ethylendiaminu **40** a zahříván na 75 °C po dobu 30 min. Po odreagování a ochlazení na RT byl přidán aceton. Po přidání acetonu nejdříve vznikala medovitá látka, která po několikanásobném přesrážení z acetonu přešla ve žlutý prášek. Ani tato metoda neposkytla čisté monosubstituované produkty.

### **Syntéza s ekvivalentem diaminu v DMF s přidavkem TEA**

Z důvodu zvýšení rozpustnosti výchozího chlor derivátu **6** byl jako rozpouštědlo zvolen DMF, pak reakce probíhala v roztoku, nikoli v suspenzi jako v předchozích reakcích. K roztoku chlor derivátu **6** v DMF byl přidán ekvivalent diaminu a 2eq TEA. Směs byla zahřívána a míchána při 115 °C. Zprvu vzniklá sraženina se postupně rozpustila. Změna fáze a průběh v roztoku značně zkrátil reakční dobu oproti postupu v acetonu, k odreagování docházelo do dvaceti minut (*Tab. 5*). DMF byl téměř odpařen na RVO, dále k destilován s toluenem, následně s methanolem. Vzniklý černý hustý

olej byl přečištěn sloupcovou chromatografií. Vzhledem k velké polaritě se jako jediná vhodná mobilní fáze po sérii neúspěšných dělení osvědčil methanol. Avšak ani s použitím čistého methanolu se nepodařilo produkty pomocí zmíněné chromatografie purifikovat. Byly vyzkoušeny i mobilní fáze s 5% zastoupením báze jako pyridin či TEA, nicméně přítomnost báze účinnost separace neovlivnila.

### **Syntéza s 2 – 2.5 ekvivalentem diaminu v suchém 1,4-dioxanu**

Po sérii neúspěšných reakcí byl zvolen postup vycházející ze syntézy francouzských autorů.<sup>15</sup> Ekvivalent chlor derivátu **6** s ethylendiaminem **40** je s přidavkem báze zahříván na 45 °C v bezvodém 1,4-dioxanu (*Schéma 13*). Jako báze byl přidán 1 eq. DIPEA. Nejprve byl 1,4-dioxan vysušen přidavkem MgSO<sub>4</sub>. K odreagování došlo po 7 hodinách, produkt byl zfiltrován a promyt dioxanem. Analogická reakce s propylendiaminem **41** doreagovala po značně delší době, téměř po dvou dnech. Po 1 dni byl přidán 0.5 eq báze i diaminu z důvodu možného zkrácení reakční doby. Po odpaření rozpouštědla bylo získáno více než 100% teoretického výtěžku, což indikovalo přítomnost solí a výsledky MS analýzy opět potvrdily přítomnost disubstituovaného a dokonce trisubstituovaného produktu u derivátu **7**.

Vedle podrobně popsaných metod byly zkoušeny i postupy zahrnující různou posloupnost přidávání jednotlivých reagentů (roztok chlor derivátu kapat do roztoku diaminu), další rozpouštědla (acetonitril, ethanol) a variabilní teploty (5 °C, RT). Nicméně ve všech případech týkajících se alifatických diaminů LC-MS analýza prokázala vznik směsi mono a disubstituovaného produktu.

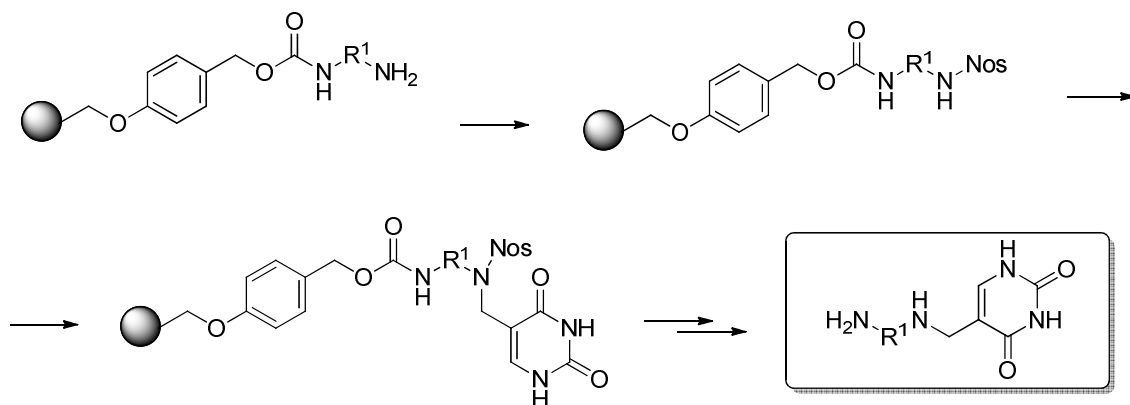
Při syntéze diamino derivátů byla snaha o monitorování reakce pomocí TLC, bohužel se však nepodařilo najít vhodnou mobilní fázi. Zkoušeny byly systémy o různé polaritě bez i s přítomností báze. Nejvhodnější se ukázala soustava *i*-propanol:NH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (7:2:1, v/v), vyvíjení ovšem trvalo nepříjemně dlouhou dobu (cca 20 min).

Přes veškeré snahy o reprodukci postupů popsaných v literatuře se podařilo v čisté formě připravit pouze aromatický diamino derivát **45**. Neúspěch ve srovnání s literaturou může být připisován izolační technice (některé z publikovaných prací využívají k purifikaci Dowex či Sephadex) a v případě publikace z roku 1998<sup>14</sup> by se podle uvedených výsledků <sup>1</sup>H NMR spektra dalo polemizovat, zda autoři opravdu připravili diamino derivát v čisté formě.



### 4.3. Alternativní metoda přípravy diamino derivátů

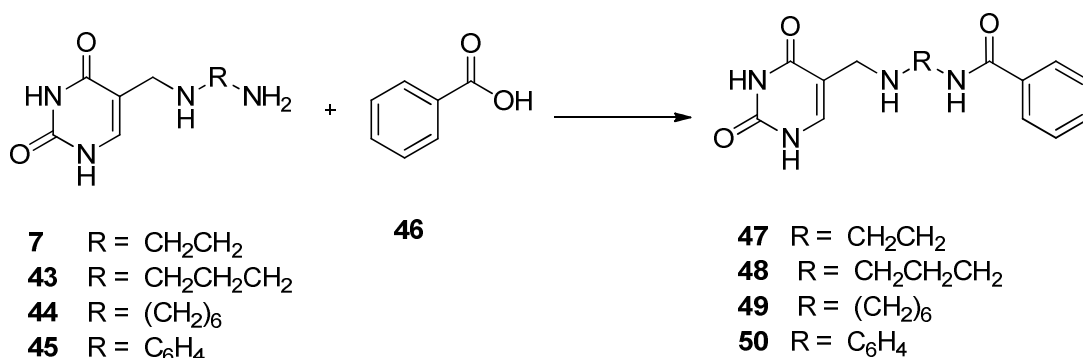
I přesto, že literatura popisuje syntézu některých diamino derivátů uracilu, žádný z popsaných postupů však nevedl k syntéze cílových derivátů v uspokojivé čistotě. Téměř ve všech případech docházelo ke znečištění produktu minoritním podílem disubstituované látky, jehož purifikace se navzdory všem snahám nezdařila. Řešením celého problému by mohla být alternativní syntéza navržená na níže uvedeném *Schématu 14*. Tato syntetická cesta designovaná na principu solid-phase syntézy využívá Wang linkeru navázaného na pryskyřici, na který je nejprve navázán požadovaný diamin. Primární aminová funkce je následně selektivně ochráněna a následuje substituce chloromethyluracilem. Konečnou denosylací a štěpením pryskyřice vzniká požadovaný derivát.



**Schéma 14.** Alternativní metody přípravy diamino derivátů.

### 4.4. Příprava karboxamidů uracilu a jejich izolace

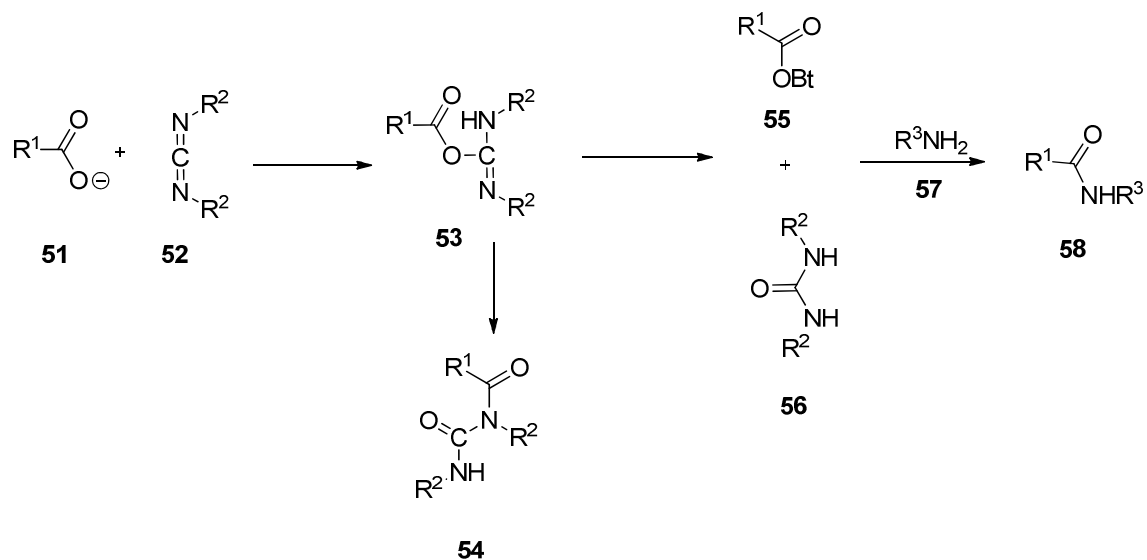
Dalším krokem v navržené strategii byla reakce diamino derivátů uracilu s karboxylovými kyselinami, přičemž pro vývoj metodiky byla zvolena snadno dostupná kyselina benzoová **46** (*Schéma 15*). I přesto, že diaminy **7**, **43** a **44** nebyly připraveny v čisté formě, byly použity pro další reakci s předpokladem, že vzniklý karboxamid bude disponovat vlastnostmi přijatelnějšími pro možnou purifikaci rekrystalizací či kapalinovou chromatografií.



**Schéma 15.** Acylace diamino derivátů.

Obecně se syntézy karboxamidů se ve většině přístupů potýkají s nízkými výtěžky, racemizací, degradací a obtížnou purifikací.<sup>5</sup> Jedním z možných přístupů k tvorbě amidové vazby je využití karbodiimidů jako konjugačních činidel a 1-hydroxybenzotriazolu.<sup>5,37</sup> Vhodnými karbodiimidy používanými k acylačním reakcím jsou DCC<sup>3</sup>, DIC, EDC nebo WSC.HCl. Jednotlivé karbodiimidy je vhodné volit s ohledem na reakční prostředí, případně na postup izolace produktů. EDC či WSC.HCl jsou hojně využívány při syntéze ve vodném či alkoholickém prostředí, DIC se přednostně využívá při syntéze na pevné fázi, kde se uplatňuje vyšší rozpustnost močoviny DIC v DCM a tím její snadné separace.

Pro syntézu výše zmíněných derivátů byla nejdříve zvolena reakce založená na obecném postupu znázorněném na *Schématu 16*.



**Schéma 16.** Obecný postup karbodiimidové syntézy.

Při této reakci nejprve reaguje karboxylová kyselina **51** s karbodiimidem **52** za tvorby kombinovaného anhydridu *O*-acylisomočoviny **53**, který následně přímo reaguje

s aminoskupinou za tvorby amidu **58** a močoviny **56** jako vedlejšího produktu. Hnací silou ovlivňující rychlost reakce je právě tvorba močoviny. V klíčovém kroku tvorby kombinovaného anhydridu se často vyskytuje přenos acylu a tvorba nereaktivního izomeru *N*-acylisomočoviny **54**. Tento přenos lze však eliminovat vhodnými reakčními podmínkami, přesněji nízkou teplotou 0°C. Mimo jiné lze také předejít tvorbě nereaktivního derivátu **54** přidáním selektivního nukleofilu HOBt. Hydroxybenzotriazol převádí kombinovaný anhydrid kyseliny na ester **55**, který se tvoří rychleji v porovnání s přenosem acylu.<sup>5</sup>

Výše zmíněný postup založený na karbodiimidové metodě byl aplikován na přípravu derivátů odvozených od diaminouracilů. Kombinovaný anhydrid figurující v acylační reakci byl připravován odděleně reakcí kyseliny benzoové s DIC v bezvodém DMF, přidavkem HOBt byl převeden na odpovídající ester. Průběh reakce vzniku esteru byl monitorován pomocí TLC, k odreagování docházelo po 45 – 60 minutách za chlazení. K připravenému esteru kyseliny byl následně přikapán diamino derivát uracilu v sušeném DMF opět za chlazení reakční směsi. Bezvodý DMF byl zvolen jako rozpouštědlo vzhledem k jeho značným rozpouštěcím schopnostem, jelikož připravené diamino deriváty uracilu byly ve většině rozpouštědel omezeně rozpustné, naopak kyselina benzoová **46** se rozpouštěla okamžitě. Acylace následně probíhaly za laboratorní teploty a jejich průběh byl sledován pomocí TLC a LC-MS analýzy. Monitorování pomocí TLC bylo opět ztíženo značnou polaritou diamino derivátů, pro které se nepodařilo najít vhodnou mobilní fázi ani s ohledem na vznikající karboxamidy. Podle LC-MS byla reakční doba byla značně dlouhá, v řádu několika dní. Zdánlivou nereaktivnost je pravděpodobně možné přičíst přítomnosti diamino derivátu částečně ve formě soli či disubstituovaných derivátů.

Na základě LC-MS analýz je možné usoudit, že karboxamidovou syntézou vznikal minoritní podíl požadovaného produktu ve směsi s několika vedlejšími produkty, které představovaly výchozí diamino derivát, ale také stopy acylovaného diamino derivátu. Komplikovaná se opět ukázala být izolace z vysoko vroucího rozpouštědla a oddělení vzniklé močoviny. Při opakování reakce byl tedy namísto DMF použit acetonitril.<sup>38</sup> Odpaření DMF bylo také nahrazeno vysrážením produktu přidavkem diethyletheru. Přehled reakčních podmínek provedených experimentů je uveden v *Tab. 6*.

**Tab. 6.** Přehled reakčních podmínek karbodiimové syntézy.

derivát	reakce	diamino derivát	CDI	solvent	$\tau$ (h)
47	1	7	DIC	DMF	101
	2	7	DIC	DMF	146
	3	7	DIC	DMF	161
	4	7	DIC	CH <sub>3</sub> CN	116
48	1	44	DIC	DMF	30
	2	44	DCC	DMF	99
	3	44	DIC	DMF	116
	4	44	DIC	DMF	140
49		45	DIC	DMF	116
50		56	DIC	DMF	116

Ve vysráženém surovém produktu **47** reakce **1** byl zastoupen požadovaný karboxamid, ze spektra analýzy LC-MS bylo ovšem možné potvrdit i zastoupení výchozího diamino derivátu, diisopropylmočoviny, nezreagovaného esteru a dokonce stopy acylovaného disubstituovaného diamino derivátu. Ve spektru analogické reakce **2** přípravy derivátu **47** byl opět zastoupen karboxamidový derivát, ovšem bylo možné pozorovat i sloučeninu, jejíž molekulová hmotnost odpovídala acylovanému ethylendiaminu **7**. Jelikož nebyla tato látka izolována, nelze jednoznačně potvrdit její identitu. Izolovaná směs tedy pravděpodobně představovala acylovaný ethylendiamin spolu s vedlejšími produkty v podobě nezreagovaného esteru kyseliny či acylovaného disubstituovaného produktu. S delší reakční dobou vzrůstalo ve směsi zastoupení látky s molekulovou hmotností odpovídající právě zmiňovanému acylovanému diaminu **40**. Stejně látky jako v případě reakce **2** bylo možné pozorovat v MS spektrech i u reakce **3**. U poslední reakce **4** byl jako solvent použit acetonitril, který byl po ukončení reakce odpařen. V hmotnostním spektru vzniklé směsi látek byl ve větší míře zastoupen především nezreagovaný ester kyseliny.

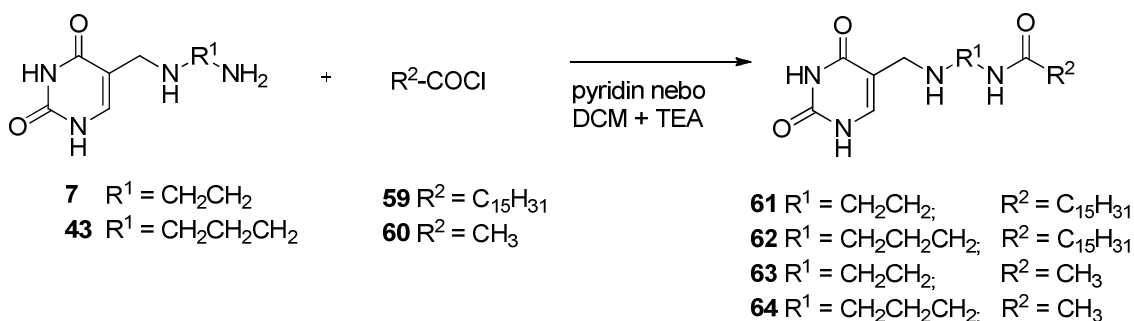
Analogicky byl připravován i derivát **48** odvozený od propylendiaminu. Výsledky jednotlivých reakcí jsou opět shrnuty v *Tab. 6*. Přídavek DEE k reakční směsi **48** v případě reakce **1** vedl opět k tvorbě sraženiny, nicméně v případě reakce **2** neměl stejný efekt, neboť u tohoto derivátu se vysrážela především výchozí látka **43**. Ta byla odstraněna filtrací, filtrát byl odpařen a produkt reakce **2** vysrážen až přídavkem acetonu. V obou izolovaných směsích se kromě produktů **48** vyskytovaly podle LC-MS analýzy současně výchozí látka **43**, karboxamid disubstituovaného diamino derivátu a opět i nezreagovaný ester.

V případě derivátu **49** byla reakční směs po ukončení reakce zfiltrována, čímž byl odstraněn pevný podíl představující diisopropylmočovinu a výchozí diamin **44**, DMF (filtrát) byl poté odpařen a látka vysrážena přidávkem acetonu, zfiltrována a vysušena. Ve spektru izolované směsi byl identifikován derivát **49**, dále byly zastoupeny sloučeniny odpovídající karboxamidu kyseliny benzoové **46** s hexylendiaminem **42** a část představovala i zde výchozí látka **44**. Byly identifikovány též stopy karboxamidu disubstituovaného diamino derivátu.

Reakční směs derivátu **50** byla nalita na led a extrahována EtAc. Organické vrstvy byly vysušeny nad  $MgSO_4$  a odpařeny. Analýza LC-MS potvrdila přítomnost produktu ve vodné fázi, proto byla vodná fáze odpařena a medovité residuum bylo zředěno toluenem. Po přidavku toluenu došlo k precipitaci, sraženina byla tedy zfiltrována a analyzována LC-MS. Směs se skládala z produktu **50** a odpovídajícího karboxamidu *p*-fenylendiaminu **19** a kyseliny benzoové **46**. Snahou bylo výsledné produkty purifikovat sloupcovou chromatografií, ale vzhledem k polaritě látek byla tato izolace neschůdná.

Vzhledem k tomu, že ve všech případech výše uvedených reakcí docházelo ke vzniku směsí více látek, nejsou v tabulkách uváděny výtěžky jednotlivých reakcí, protože by tato data byla značně zkreslená.

Tvorba anhydridu a posléze esteru v popsané karbodiimidové syntéze byla provázena komplikacemi, jak je popsáno výše, ať už se jednalo o problematické odstraňování močoviny či přenos acylu. Samotné karboxylové kyseliny nejsou příliš reaktivní a při reakcích vyžadují vyšší teplotu. Proto bývají při acylačních reakcích voleny reaktivnější funkční deriváty karboxylových kyselin, jako jsou anhydridy či halogenidy. Jelikož jsou halogenidy karboxylových kyselin nejreaktivnějšími deriváty, byla jako alternativní postup realizována acylační reakce s dostupnými acylchloridy, konkrétně s palmitoylchloridem **59** a acetylchloridem **60** (Schéma 17).<sup>39</sup>



**Schéma 17.** Acylační reakce diamino derivátů s acylchloridy.

První ze syntéz v tomto směru byla zaměřena na přípravu derivátů **61** a **62** (Tab. 7). Diamino deriváty **7** a **43** byly nejprve rozsuspendovány v pyridinu, který byl použit jako rozpouštědlo a současně představoval bázi důležitou v další fázi reakce k navázání uvolněného chlorovodíku. Tato suspenze byla ochlazená v ledové lázni, přikapány 4 ekvivalenty chloridů **59** či **60** a směs byla nadále míchána za laboratorní teploty. Pyridin byl po doreagování oddestilován na RVO, k destilován s toluenem a následně s methanolem. Po odpaření a posledním přidavku methanolu došlo k vysrážení produktu, který byl zfiltrován. Surový produkt v případě aminoethylaminomethyluracilu **61** obsahoval stále část nezreagované výchozí látky **7**. Prodloužení reakční doby nemělo na doreagování vliv. Ve spektru LC-MS bylo tedy možné rozeznat výchozí látku **7**, její disubstituovaný derivát a produkt **61**. Vzhledem k dlouhému lipofilnímu alkylovému zbytku byl retenční čas karboxamidu značně prodloužen oproti výchozímu diamino derivátu, nicméně izolaci stále stěžovalo hledání vhodné mobilní fáze pro CC. Namísto pyridinu byl v opakované reakci použit DCM s přidavkem TEA. DCM byl odpařen a produkt vysrážen ve formě směsi methanolem.

Karboxamid diaminopropyl derivátu **43** byl připravován analogicky diaminoethyl derivátu **7**, opět byl z reakční směsi po oddestilování rozpouštědla vysrážen methanolem a zfiltrován. I v případě tohoto derivátu vznikala směs několika látek.

Stejným provedením reakce diamino derivátu **7** s acetylchloridem **60** byl vysrážen surový produkt **63**. Po oddestilování pyridinu a k destilaci s toluenem a methanolem byla látka vysrážena chloroformem a zfiltrována. Zfiltrovaný produkt opět nepředstavoval čistou látku. V hmotnostním spektru byl kromě produktu identifikován i diacylovaný derivát a další neidentifikované produkty. Ve spektru nebyla patrná přítomnost výchozí látky **7**.

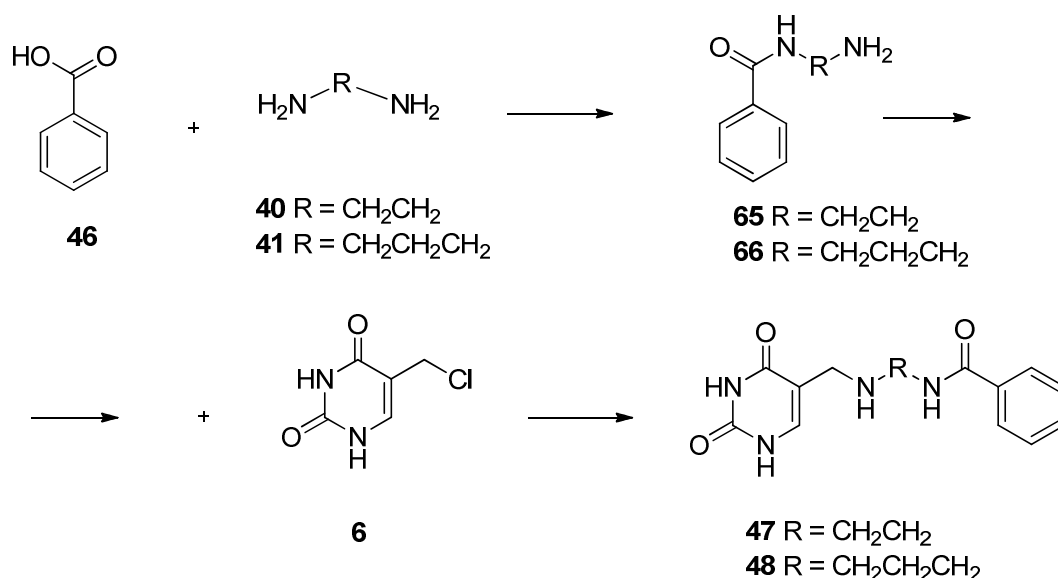
Derivát **64**, syntetizovaný a vysrážený způsobem analogickým derivátu **63**, byl opět získán ve formě směsi více látek. Výsledky shrnuje Tab. 7. Produkt **63** představoval hlavní složku izolované směsi, avšak byl přítomen i diacylovaný derivát či acylovaný disubstituovaný diamino derivát a výchozí látka **43**. Snaha o purifikaci acyl derivátu **64** s využitím kapalinové chromatografie byla bohužel neúspěšná.

**Tab. 7.** Přehled reakčních podmínek acylačních reakcí acylchloridy.

derivát	reakce	diamino derivát	acylchlorid	solvent	$\tau$ (h)
<b>61</b>		7	palmitoyl-Cl	pyridin	100
<b>62</b>	1	44	palmitoyl-Cl	pyridin	100
	2	44	palmitoyl-Cl	DCM	36
<b>63</b>		7	acetyl-Cl	pyridin	36
<b>64</b>		44	acetyl-Cl	pyridin	36

#### 4.5. Syntéza synthonů s následnou substitucí chloromethyl derivátu

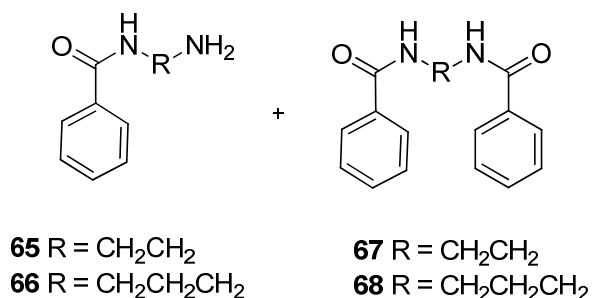
Vzhledem k dlouhé reakční době, nižším výtěžkům a obtížné izolaci produktů při syntéze karboxamidových derivátů, a rovněž ke vzniku disubstituovaných diaminoalkyl/aryl derivátů uracilu byl vyzkoušen i alternativní způsob přípravy cílových derivátů spočívající v přípravě karboxamidu volného diaminu s následnou substitucí chloromethyluracilu **6** tímto připraveným karboxamidem (Schéma 18).



**Schéma 18.** Syntéza synthonů a následná substituce chlor derivátu **6**.

V přístupu k syntéze synthonů je znovu možné volit mezi více postupy, které jsou ve své podstatě shodné či velmi podobné přípravě karboxamidových derivátů diamino uracilů.

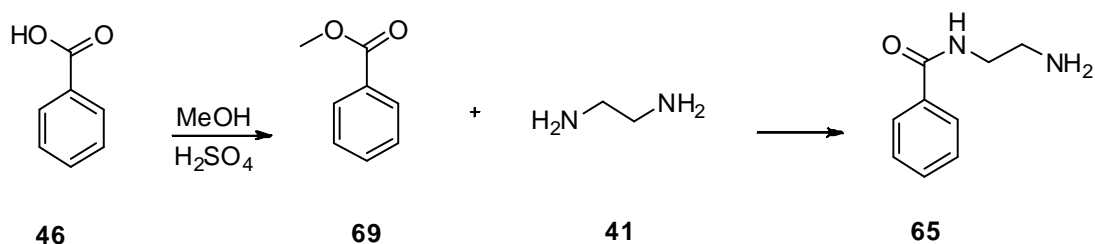
První z těchto přístupů přípravy synthonů karboxamidů **65** a **66** se neliší od původní karbodiimidové syntézy a využívá DCC, HOBt v prostředí CH<sub>3</sub>CN (Schéma 18).<sup>3, 5, 40, 41</sup> Reakční prostředí acetonitrilu přináší výhodu snadnějšího odstranění níže vroucího rozpouštědla, zároveň se přednostně v acetonitrilu rozpouští monoacylovaný produkt na rozdíl od diacylovaných produktů **67** a **68**, které v průběhu reakcí rovněž vznikají (Obr. 7). Zastoupení diacylovaného produktu je obecně možné minimalizovat úpravou reakčních podmínek a provedením dané reakce tj. přidáváním kyseliny v co nejmenší koncentraci (s použitím většího objemu rozpouštědla) k nadbytku diaminu v minimálním množství rozpouštědla (celkově velké koncentraci) a to po delší dobu za energetického míchání a za ochlazení na teplotu 0 °C a nižší.<sup>26, 26, 42, 42</sup>



**Obr. 7.** Struktury monoacylovaných a diacylovaných synthonů.

Kyselina benzoová **46** byla rozpuštěna ve velkém objemu CH<sub>3</sub>CN a k roztoku byl přidán ekvivalent DCC rozpuštěný v minimálním množství téhož rozpouštědla a ekvivalent HOBt. Tvorba esteru kyseliny byla opět monitorována TLC. Paralelně byl připraven silně koncentrovaný roztok diaminu **40** či **41** v CH<sub>3</sub>CN, který byl ochlazen v ledové lázni se solankou na téměř -5 °C. K chlazenému roztoku diaminu **40** byla pak za energetického míchání přikapávána po dobu 30 minut chlazená suspenze esteru kyseliny. Reakce i nadále probíhala v suspenzi a reakční směs byla ponechána v ledové lázni a její průběh byl monitorován TLC se systémem mobilní fáze CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> (4:1:0,1 v/v). Reakce byla ukončena po 93 hodinách, sraženina byla zfiltrována a promyta acetonitrilem. Precipitát představoval právě diacylovaný produkt **67**, což bylo patrné i z LC-MS spektra, ve kterém bylo možné identifikovat volnou karboxylovou kyselinu **46**, diacylovaný produkt **67** a zároveň dicyklohexylmočovinu. Filtrát pak představoval směs produktu **65** a dicyklohexylmočoviny. Postup přípravy derivátu **66** byl totožný s předchozím derivátem. Analýzou LC-MS zfiltrovaného precipitátu byl identifikován produkt **66** a dicyklohexylmočovina. Filtrát rovněž představoval směs několika látek. Jeden z podílů směsi tvořil diacylovaný produkt **68**, byl ovšem přítomen i monoacylovaný derivát **66** a současně dicyklohexylmočovina.

Vzhledem k přítomnosti mono i diacylovaných produktů byl vyzkoušen i druhý přístup syntézy vycházející z methylesteru kyseliny benzoové **69**<sup>5,43,44</sup>, který reaguje přímo s diaminem (Schéma 19).



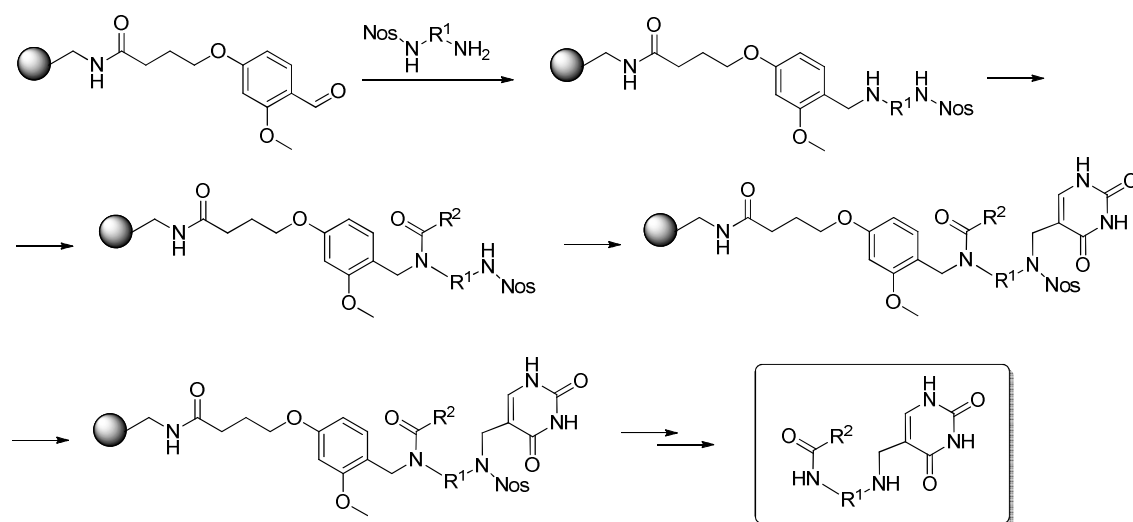
**Schéma 19.** Příprava synthonu acylací methylesteru kyseliny.



Methylester **69** byl připraven kyselé katalyzovanou esterifikací podle Fischera<sup>44</sup>, rovnováha esterifikace byla posouvána nadbytkem alkoholu. Kyselina benzoová **46** byla rozpuštěna v nadbytku methanolu a k roztoku bylo přidáno několik kapek koncentrované kyseliny sírové jako katalyzátoru reakce. Směs byla refluxována 5 hodin. Nadbytečný methanol byl oddestilován, methylbenzoát **69** extrahován DCM a promyt opakovaně 5% NaHCO<sub>3</sub> až do bazického pH vodné vrstvy. K připravenému methylesteru **69** byl přidán ethylendiamin **40** a H<sub>2</sub>O. Roztok byl refluxován po dobu 10 h, průběh reakce byl sledován TLC systémem toluen:CH<sub>3</sub>CN (5:2 v/v). Již analýza TLC indikovala ještě větší množství vznikajících látek v porovnání s karbodiimidovou syntézou, proto se vzhledem k množství použité výchozí látky od izolace produktu **65** upustilo.

#### 4.6. Alternativní metoda přípravy karboxamidů

Vzhledem k problematické přípravě výše uvedených karboxamidových analog uracilu byla i v tomto přípravě navržena alternativní syntéza využívající solid-phase syntézu (*Schéma 20*). Zvolené diaminové linkery jsou nejprve na jedné z amino funkcí ochráněny reakcí s nosyl chloridem. Následná reductivní aminace BAL linkeru připojeného k pevné fázi poskytne chráněný diamino derivát. Další krokem je selektivní acylace na druhou z amino funkcí, substituce chloromethyluracilem, denosylace a konečné štěpení cílové struktury z pryskyřice.



**Schéma 20.** Alternativní metoda přípravy karboxamidů.

#### 4.7. Syntéza alkyl/arylaminomethyl derivátů

Na závěr byla zkoumána reaktivita chloromethyluracilu **6** k vybraným amino derivátům **70a-k** (Schéma 21), která nabízela možnost srovnání této reaktivity s předchozími diamino deriváty.

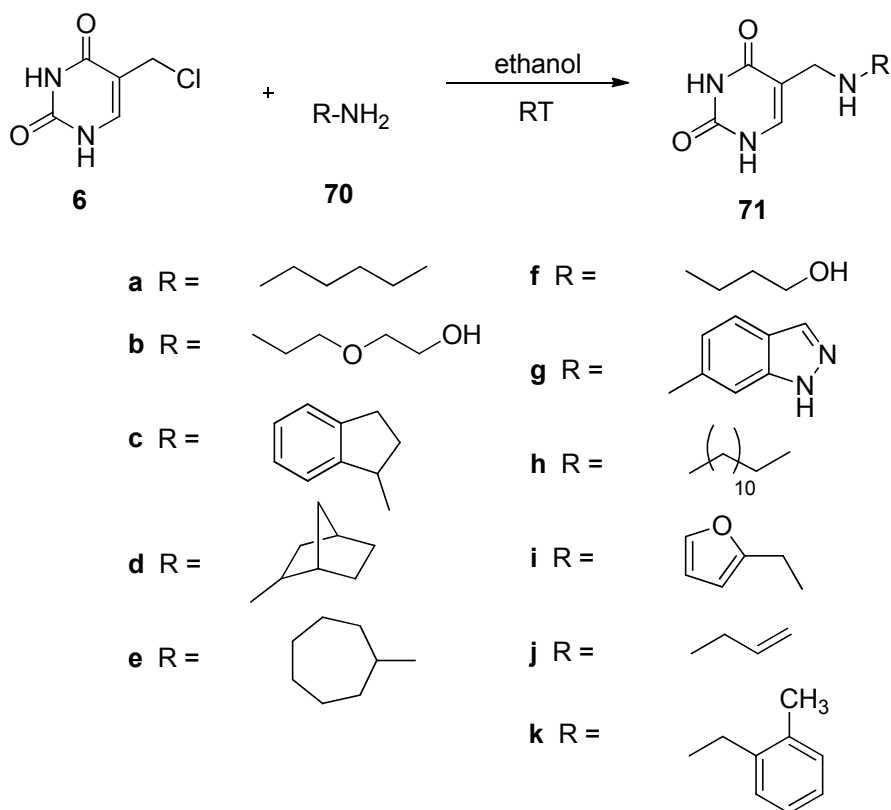


Schéma 21. Příprava alkyl/arylaminomethyl derivátů.

Metodika přípravy využívala postup popsany pro podobné deriváty<sup>45</sup>, spočívající v reakci chlor derivátu **6** s 2 ekvivalenty aminu v ethanolu za RT. Chloromethyluracil **6** byl rozsuspendován v ethanolu, přidán k roztoku 2-2.5 eq amino derivátu **70a-k** v ethanolu a za laboratorní teploty míchán přes noc. 0.5 ekvivalent byl přidáván po 24 hodinách k původnímu dvouekvivalentnímu přebytku za účelem zkrácení reakční doby. Po odreagování, v rozmezí 24 - 36h, byl produkt zfiltrován, promyt ethanolom a diethyletherem. Ve LC-MS spektru je však možné i u většiny těchto sekundárních aminů nalézt dialkylované produkty (Tab. 8.). Jistou výjimku tvoří derivát **71g**, u kterého byl opět pozorován trend nižší reaktivity aminoskupiny aromatického aminu, a tato látka vznikala v čisté formě v podobě monosubstituovaného produktu ve výtěžku 67%. Druhou výjimku z této řady představoval amin **70k**, který s 5-chloromethyluracilem **6**

také reagoval za vzniku směsi produktů, z reakční směsi však docházelo k prvotnímu vysrážení disubstituovaného produktu **72k** (Schéma 22), který byl izolován ve výtěžku 38%.

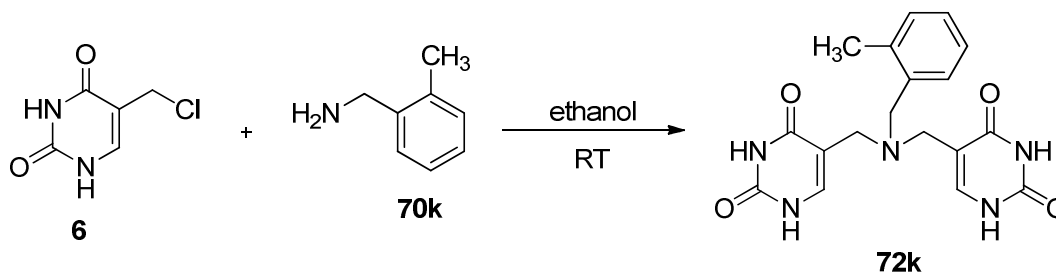


Schéma 22. Příprava derivátu **72k**.

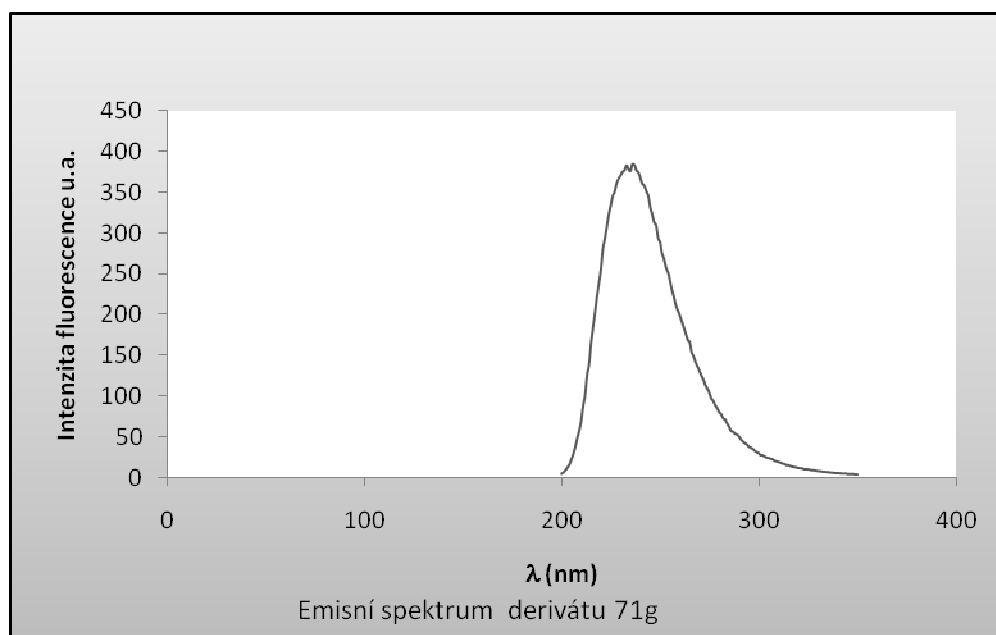
Tab. 8. Přehled reakčních podmínek přípravy aminoalkyl/aryl derivátů **71** a **72**.

<b>71</b>	<b>reakce</b>	<b>amino derivát</b>	<b><math>\tau</math> (h)</b>	<b>výtěžek %</b>	<b>LC - MS</b>
<b>a</b>		2 eq	ON	34	MSd + DSd
<b>b</b>		2 eq	ON	55	MSd + DSd
<b>c</b>		2 eq	ON	40	MSd + DSd
<b>d</b>		2 eq	ON	43	MSd + DSd
<b>e</b>		2.5 eq	36	46	MSd + DSd
<b>f</b>		2.5 eq	36	79	MSd + DSd
<b>g</b>	1	2.5 eq	36	68	MSd
	2	2.5 eq	36	89	MSd
<b>h</b>		2.5 eq	36	31	MSd + DSd
<b>i</b>		2.5 eq	36	36	MSd + DSd
<b>j</b>		2.5 eq	36	17	MSd + DSd
<b>k</b>		2 eq	ON	38	DSd ( <b>72k</b> )

MSd= monosubstituovaný derivát, DSd = disubstituovaný derivát, ON = over night

Derivát **71g** vykazoval již při průběžné TCL analýze výraznější fluorescenci, která byla proto změřena. Vzorek byl připraven rozpuštěním derivátu **71g** v DMSO o výsledné koncentraci 0,1mg/ml a kvantový výtěžek byl určen srovnáním s fluorescenčním standardem chinin sulfátem v 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $\phi = 0.577$ ). Hodnota kvantového výtěžku derivátu **71g** činila 2,07%. Derivát vykazoval nejvyšší excitaci při  $\lambda_{\max}$  327nm, emisní spektrum je znázorněno níže (Graf 1). Velikost kvantového výtěžku derivátu **71g** nedosahuje hodnot porovnatelných s fluorescenčními značkami, nicméně je znatelná a bylo by možné zvážit její potenciální využití v laboratorních syntézách.

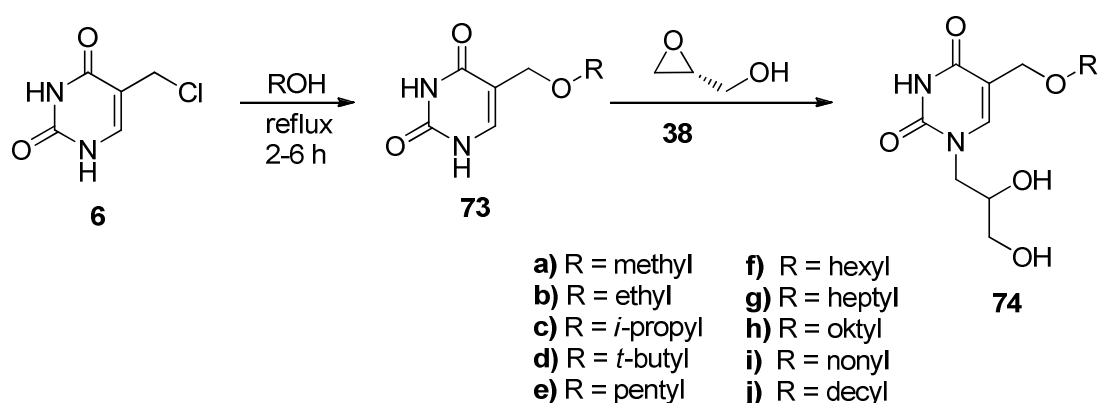
**Graf 1.** Emisní spektrum derivátu **71g**.



#### 4.8. Metody přípravy acyklických nukleosidů

Jednou z rámcových částí zadaného tématu byla i enantioselektivní příprava acyklických nukleosidů nově připravených karboxamidových a diaminoalkyl/aryl derivátů reakcí s (*R*)-(+)-glycidolem v pozici N1 uracilového skeletu. Vzhledem k tomu, že se příprava cílových diamino derivátů dlouhou dobu nedařila, metodika syntézy acyklických nukleosidů byla paralelně se syntézou diaminů vyvíjena a optimalizována na sérii již známých alkyloxymethyl derivátů uracilu.

Za tímto účelem byly připraveny výchozí alkoxyderiváty **73** dle postupu vyvinutého na Katedře organické chemie<sup>46</sup> a demonstrováno na *Schématu 22*.



**Schéma 22.** Syntéza alkoxyderivátů uracilu.

Získané alkoxyderiváty **73** byly následně substituovány v poloze N1 (*R*)-(+)-glycidolem **38**, přičemž bylo vyzkoušeno několik metod. První z nich využívala reakce výchozího derivátu uracilu s glycidolem probíhající v DMF za přítomnosti bazického katalyzátoru při různých teplotách, či ve vodě s přídavkem NaOH. Všechny reakční podmínky jsou shrnuty v *Tab. 9*. Podle popsaných postupů byl pro reakci volen uhličitan draselný či cesný<sup>47</sup> nebo NaOH<sup>48</sup> a teploty v rozmezí 40-110 °C. Reakční doba se pohybovala mezi 9 – 25 hodinami. Průběh reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií, která signalizovala vznik směsi od samého počátku reakce a ke kvantitativnímu odreagování výchozí látky nedošlo ani při změně reakčních podmínek (*Tab. 9*). V případě přípravy derivátu **74b** reakcí **1** je možné dle analýzy LC – MS identifikovat opět pravděpodobně dvojnásobně substituovaný produkt (glycidolový derivát pravděpodobně atakuje i N3 uracilového cyklu), jehož zastoupení vzrůstalo u opakovaných reakcí s teplotou, ovšem zřejmě nedošlo k otevření druhého oxiranového kruhu. U monosubstituovaného derivátu však k otevírání oxiranového kruhu docházelo ve všech reakcích.

Derivát **74f** byl připravován opět za nižší teploty v porovnání s **74d** s předpokladem nižšího zastoupení disubstituovaného produktu (reakce **1**).

V obměněném postupu, kdy byla jako reakční prostředí zvolena voda a použitou bází byl hydroxid sodný (reakce **2**), byl poměr mono a disubstituovaného produktu **74f** rovnocenný, navíc byla ovšem ve směsi přítomná i výchozí látka ve stejném množství.

**Tab. 9.** Přehled reakčních podmínek příprav acyklických nukleosidů.

alkoxyderivát	reakce	glycidol	$\tau$ (h)	t (°C)	báze
<b>74b</b>	1	1 eq	13	75	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	2	1 eq	25	110	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	3	1 eq	20	110	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	4	1.5 eq	18	110	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<b>74d</b>	1	1 eq	20	105	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	2	1 eq	28	105	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	3	1.5 eq	18	105	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<b>74f</b>	1	1.5 eq	9	85	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	2	1.5 eq	18	40-45	NaOH

Navzdory vznikající směsi více látek ve všech uvedených reakcích byla vyvinuta metodika purifikace požadovaných derivátů s využitím kapalinové chromatografie s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1, v/v) a po reakci hexyloxy derivátu **73f** s 1.5

ekvivalentem (*R*)-(+)-glycidolu v DMF za teploty 85 °C po dobu 9 hodin byl pomocí této metody izolován požadovaný produkt **74f**.

Protože při všech výše uvedených reakcích vznikala směs látek, byl zkoušen i alternativní způsob přípravy zahrnující silylaci výchozí nukleobáze HMDS s následnou reakcí s glycidolem. Tato metoda se ovšem neukázala být příliš vhodná.

Příprava acyklických nukleosidů alkoxyderivátů je tedy realizovatelná prvně uvedeným postupem s přidáním báze a reakcí probíhající v DMF, je ovšem nutné zvážit teplotu reakce, vzhledem k vzniku dvojnásobně substituovaných produktů. Po optimalizaci tohoto postupu a nalezení vhodné purifikační metody by tedy mohly být tyto reakce využity k přípravě acyklických nukleosidů výše popisovaných diamino, karboxamido či případně amino derivátů uracilu.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Metody

Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO –  $d_6$  na Bruker AMX-300 spektrometru (300 MHz) s vnitřním standardem TMS. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty v Hz. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru TSQ Quantum ACCES, THERMO SCIENTIFIC, USA. Fluorescence byla změřena fluorescenčním spektrofotometru Cary Eclipse firmy Varian. Silikagel použitý při kapalinové chromatografii Silicagel 60 (0.04-0.063 mm) firmy Merck. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck.

### 5.2. Přípravy

#### 5-chloromethyluracil **6**

5-hydroxymethyluracil **1** (0.25 g, 1.76 mmol) byl rozsuspendován v koncentrované HCl (15 ml), směs byla míchána za RT po dobu dvou hodin. Sraženina byla následně zfiltrována, promyta HCl a uložena do exsikátoru. Výtěžek 0.18 g (64%), m.p. 228-232 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.41 (s, 2H); 7.75 (d,  $J=5.85$  Hz, 1H); 11.01 (br.s., 1H); 11.28 (br. s., 1H). MS m/z pro  $\text{C}_6\text{H}_5\text{ClN}_2\text{O}_2$ : 160,56, nalezeno 159.45 [M-1].

#### 4-(((2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)methyl)amino)benzenaminium chloride **49**

5-chloromethyluracil **6** (0.5 g, 4.14 mmol) byl rozsuspendován v acetonu (30 ml) a za stálého míchání zahříván na teplotu 60 °C. K suspenzi byl pozvolna přikapán horký roztok *p*-fenylendiaminu **15** (0.67 g, 6.23 mmol) v acetonu (20 ml). Směs byla refluxována po dobu 5 hodin. Produkt byl zfiltrován, promyt horkým acetonem a přesrážen z MeOH jako tmavě zelený prášek ve výtěžku 0.49 g (67%), m.p. 242-246 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.83 (s, 2H); 6.61 (d,  $J=8.42$  Hz, 2H); 6.78 (s, 3H); 6.95 (d,  $J=8.42$  Hz, 2H); 7.27 (s, 1H); 11.15 (br. s., 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  109.67, 114.01, 121.68, 139.53, 151.76, 164.80. MS m/z pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ : 232,24, nalezeno 233.07 [M+1] $^+$ .

### **5-(((1H-indazol-6-yl)amino)methyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione 71g**

5-chloromethyluracil **6** (0.20 g, 1.21 mmol) byl rozsuspendován v EtOH (4 ml). K suspenzi byla přikapána směs 6-aminoindazolu (0.40g, 3.04 mmol) v EtOH (6 ml). Směs byla míchána za RT po dobu 36 hodin. Produkt byl zfiltrován, promyt EtOH a DEE a přesrážen z MeOH ve výtěžku 0.31 g (67%). M.p. 238-240 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.88 (br. s., 2H); 6.34 (br. s., 1H); 6.55 (d, *J*=8.60 Hz, 1H); 7.24 (d, *J*=5.49 Hz, 1H); 7.39 (d, *J*=8.60 Hz, 1H); 7.74 (s, 1H) 10.74 (br. s, 1H); 11.18 (br. s. 1H). MS m/z pro C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 257,25, nalezeno 257,93 [M+1]<sup>+</sup>.

### **5,5'-(((2-methylbenzyl)azanediyl)bis(methylene))bis(pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione) 72k**

K roztoku 2-methylbenzylaminu (150 μl, 1.21 mmol) v ethanolu (1.5 ml) byla přikapávána suspenze 5-chloromethyluracilu **6** (94.3 mg, 0.59 mmol) v ethanolu (1.5 ml). Směs byla míchána za RT přes noc. Produkt byl zfiltrován, promyt EtOH a DEE za vzniku bílého prášku ve výtěžku 81.7 mg (38%). M.p. 252-254 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.21 (s, 3H); 3.16 (s, 4H); 3.48 (s, 2H); 7.06-7.12 (m, 3H); 7.24-7.33 (m, 1H); 7.45 (s, 2H); 11.02 (br. s., 2H). MS m/z pro C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: 369,37, nalezeno 370.20 [M+1]<sup>+</sup>.

### **1-(2,3-dihydroxypropyl)-5-((hexyloxy)methyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione 74f**

Ke směsi 5-[(hexyloxy)methyl]pyrimidine-2,4-(1*H*,3*H*)-dionu **73f** (61.8 mg, 0.27 mmol) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5 mg, 0.05 mmol) v DMF (1.5 ml) byl přidán (*R*)-(+)-glycidol **38** (19 μl, 0.29 mmol). Reakční směs byla vložena do olejové lázně, při 85 °C míchána 9 hodin, následně odpařena, k destilována s methanolem a čištěna pomocí kapalinové chromatografie s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1, v/v). Vznikl bílý prášek ve výtěžku 56.3 mg (69%). M.p. 68-70 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.85 (t, *J*=6.59 Hz, 3H); 1.19-1.33 (m, 6H); 1.39-1.55 (m, 2H); 3.26-3.42 (m, 6H); 3.62-3.75 (m, 1H); 4.05 (s, 2H); 4.66-4.73 (m, 1H); 5.00 (ds, *J*=5.49 Hz, 1H); 7.52 (s, 1H); 11.28 (s, 1H). MS m/z pro C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 300,35, nalezeno 300,98 [M+1]<sup>+</sup>.



## ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na syntézu derivátů uracilu substituovaných v poloze C5 variabilním alifatickým či aromatickým diaminovým zbytkem, jeho následnou acylaci za vzniku karboxamidů a možnou substituci těchto derivátů v poloze N1 za tvorby acyklických nukleosidů.

Úvodní část bakalářské práce v krátké rešerši shrnuje dosud známé aminoalkyl(aryl)methyl a vybrané karboxamidové deriváty uracilu, zaměřuje se na jejich syntézu a popisuje biologické účinky zmíněných látek. Rovněž je v této části práce prezentována kapitola demonstrující vliv modifikace přírodní báze na konformaci DNA.

Experimentální část práce v první řadě směřovala k syntéze čtyř aminoalkyl(aryl)methyl derivátů uracilu **7,43-45** založené na nukleofilní substituci 5-chloromethyluracilu **6** odpovídajícími diaminy **40-42,19**. Zdánlivě snadný průběh reakce byl doprovázen vznikem disubstituovaných produktů, jelikož nejen primární, ale i sekundární skupina diamino derivátů vykazovala zvýšenou reaktivitu k popisované nukleofilní substituci. Tento jev byl zvláště patrný u alifatických diaminů, aromatické diaminy již dvojnásobné substituci, s ohledem na nukleofilitu aromaticky vázané aminoskupiny, nepodléhaly. Vzhledem k velké polaritě syntetizovaných derivátů byla jednou z nejobtížnějších úloh, kterou se zatím bohužel nepodařilo vyřešit, purifikace požadovaných produktů. Při pokusech o optimalizaci metod, které by vedly k syntéze pouze monosubstituovaných produktů, byla vyzkoušena celá řada postupů s variabilitou rozpouštědel (methanol, aceton, dioxan) v širokém rozmezí reakčních teplot. Finálně se v čisté formě podařilo připravit pouze aromatický diamino derivát **45**, který díky své nižší reaktivitě oproti alifatickým kongenerům nevyžadoval další purifikaci.

Velká pozornost byla dále věnována vývoji metod vedoucích k acylaci připravených diamino derivátů, přičemž v první fázi byla karboxylovou kyselinou zvolena komerčně snadno dostupná kyselina benzoová. I přesto, že alifatické diaminy **7, 43-44** nebyly připraveny v čisté formě, byly pro syntézu použity s předpokladem purifikace cílového produktu. Za účelem syntézy karboxamidových derivátů bylo vyzkoušeno několik alternativních přístupů, z nichž bohužel ani jeden nevedl k optimální metodě získávání čistých produktů a byly získávány pouze směsi, které bylo obtížné purifikovat. Hlavním problémem se ukázala být značná polarita cílových látek a malá rozpustnost většiny derivátů v široké škále organických rozpouštědel, které by mohly být zvoleny v případě purifikace kapalinovou chromatografií. Veškeré snahy v tomto směru vedly k vývoji jediné soustavy, která disponovala přijatelnou dělicí schopností (*i*-propanol:NH<sub>3</sub>:voda -

7:2:1 v/v) ovšem nepříjemným časovým intervalem nutným k dělení. Poslední alternativou, která by mohla vést k úspěšné purifikaci, která však z časových důvodů nebyla zkoumána, by mohlo být využití iontoměničové chromatografie.

Reaktivita 5-chloromethyluracilu **6** v kombinaci s bazicitou použitých alifatických diamino derivátů **7,43-44** vedla ke vzniku směsí, proto je tato část předložené práce završena návrhem alternativních metod, které jsou založeny na syntéze na pevné fázi. Na takovémto řešení se v současné době pracuje.

Monoaminoderiváty **71a-j** a disubstituovaný derivát **72k**, připravované v závěru této práce, umožnily porovnání jejich reaktivity s původně připravovanými diamino deriváty. Z výsledků všech experimentů je možné usoudit, že reaktivita diamino i monoamino derivátů při substituční reakci s 5-chloromethyluracilem **6** je srovnatelná, zároveň však bylo možné potvrdit nižší reaktivitu aromatických aminů. Při přípravách alifatických diamino a monoamino derivátů byl pozorován vznik disubstituovaného produktu, kdežto v případě aromatických aminů byla formace disubstituované látky potlačena. V této sérii látek byly úspěšně syntetizovány a identifikovány dvě látky - **71g** a **72k**. První z nich disponovala zajímavou vlastností, a to zvýšenou fluorescencí, která byla změřena, a která otevírá otázku možného využití podobných derivátů jako fluorescenčních značek. Druhý z nich byl izolován z reakční směsi v podobě disubstituovaného derivátu **72k**.

Poslední část předložené práce je věnována syntéze acyklických nukleosidů. Přípravě nukleosidů odvozených od diamino a karboxamidových derivátů předcházelo nalezení vhodné metody a její optimalizace, které probíhalo paralelně s výše popsanou syntézou, na sérii 5-alkoxymethyluracilech **73a-j**. Postup přípravy spočívající v reakci alkoxytmethyluracilu s glycidolem v DMF, zvýšené teplotě a přítomnosti báze byl optimalizován a i přes některé komplikace spojené se vznikem směsí byl připraven hexyloxyderivát **74f** substitucí dusíku N1 dihydroxy zbytkem mimikujícím cukernou část klasických nukleosidů. Vzhledem k problematickým syntézám cílových diamino a karboxamidových derivátů uracilu tento postup zatím nebyl aplikován na jejich N1 modifikaci, ale může být předmětem dalšího studia.

V této bakalářské práci se podařilo připravit aromatický diamino i monoamino derivát uracilu **45** a **71g**, látku **72k** a acyklický nukleosid **74f**. Jejich identita byla potvrzena LC–MS i NMR analýzou. Připravené látky představují zástupce jednotlivých cílových derivátů a budou postoupeny testování na potenciální biologickou aktivitu.

Obecně lze říci, že deriváty uracilu s diaminoalkyl/arylmethyl substituentem představují skupinu látek, která není ještě zcela prozkoumána, ale ke které se obrací značná pozornost nejen díky přirozeně se vyskytujícímu putrescinylthyminu, ale také díky antivirové či kancerostatické aktivitě vyskytující se u některých derivátů. Struktury

těchto látek zahrnují možnosti širokého spektra využití v medicíně, imunochemii, apod.

## LITERATURA

1. Klener, P. Protinádorová chemoterapie. Galén: Praha, **1996**, p.614.
2. Onishi, T.; Mukai, C.; Nakagawa, R.; Sekiyama, T.; . *J. Med. Chem.* **2011**, *43*, 278-282.
3. Lokhande, T. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *12* (1), 6022-6.
4. Soral, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41* (4), 467-474.
5. Montalbetti, Ch. A. G. N. *Tetrahedron* **2005**, *6*, 10827-10852.
6. De Clercq, E. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 1-24.
7. De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **2010**, *31* (1), 118-160.
8. De Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73* (7), 911-922.
9. De Clercq, E.; Holy, A. *Nat. Rev. Drug. Discovery* **2005**, *4* (11), 928-940.
10. De Clercq, E. *Antiviral Res.* **2007**, *75* (1), 1-13.
11. Schaeffer, H. J. Substituted purine derivatives. DE A1 2539963, **1976**.
12. Kropinski, A. M. B.; Bose, R. J.; Warren, R. A. J. *Biochemistry* **1973**, *12* (1), 151-157.
13. Carbon, J. A. *J. Org. Chem* **1960**, *25*, 1731-1734.
14. Kim, J. C.; Lee, M. H.; Choi, S. K. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21* (4), 465-469.
15. Gavriľiu, D.; Fossey, C.; Fontaine, G.; Benzaria, S.; Ciurea, A.; Delbederi, Z.; Lelong, B.; Laduree, D.; Aubertin, A. M.; Kirn, A. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids* **2000**, *19* (5 & 6), 1017-1031.
16. Catalanotti, B.; Galeone, A.; Mayol, L.; Oliviero, G.; Rigano, D.; Varra, M. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids* **2001**, *20* (10 & 11), 1831-1841.
17. Miller, P. B.; Scraba, D. G.; Leyritz-Wills, M.; Maltman, K. L.; Warren, R. A. J. *J. Virol.* **1983**, *47* (3), 399-405.
18. Lopez, P.; Espinosa, M.; Piechowska, M.; Shugar, D. *J. Bacteriol.* **1980**, *143* (1), 50-58.
19. Warren, R. A. *Annu. Rev. Microbiol.* **1980**, *34*, 137-158.
20. Warren, R. A. J. *Curr. Microbiol.* **1981**, *6* (3), 185-188.
21. Lopez, P.; Espinosa, M.; Piechowska, M.; Shugar, D.; Warren, R. A. *J. Virol.* **1981**, *37* (2), 559-563.
22. Gerhard, B.; Warren, R. A. J. *Biochemistry* **1982**, *21* (22), 5458-5462.
23. Brigitte, G.; Warren, R. A. J. *Biochemistry* **1982**, *21* (22), 5458-5462.

24. Bruce, D. L.; Warren, R. A. J. *Can. J. Microbiol.* **1983**, 29 (7), 827-829.
25. Lopez, P.; Espinosa, M.; Piechowska, M.; Shugar, D.; Warren, R. A. J. *J. Bacteriol.* **1982**, 149 (2), 595-605.
26. Tang, W.; Fang, S. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6003-6006.
27. Levina, A. S.; Tabatadse, D. R.; Khalimskaya, L. M.; Prichodko, T. A.; Shishkin, G. V.; Alexandrova, L. A.; Zarytova, V. P. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4 (5), 319-325.
28. Rodriguez-Tanty, C.; Perez, R.; Miranda, J.; Velez-Castro, H.; Rosado, A.; Macias, A.; Galan, L.; Higginson-Clarke, D.; Riveron, A. M. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids* **1999**, 18 (4 & 5), 1113-1117.
29. Knouzi, N.; Vaultier, M.; Carrie, R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, (5), 815-819.
30. Overberger, C. G.; Ferng, W. B. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1986**, 24 (12), 3335-3348.
31. Ling, O. K. e. a. *Chin. Chem. Lett.* **1998**, 2, 314-316.
32. Giner-Sorolla, A. *J. Med. Chem.* **2010**, 9 (1), 97-101.
33. Cai, J.; Li, X.; Taylor, J. S. *Org. Lett.* **2005**, 7 (5), 751-754.
34. Giner-Sorolla, A.; Medrek, L. *Nucleic Acid Chem.* **1978**, 1, 83,85.
35. Tulecki, J.; Kalinowska-Torz, J.; Musial, E.; Nacewicz-Anjedani, H.; Senczuk, L.; Skwarski, D.; Sobolewski, H. *Acta Pol.Pharm.* **1977**, 34 (4), 359.
36. Delia, T. J. *J. Med. Chem.* **1976**, 19 (2), 344-346.
37. Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (10), 4397-4398.
38. Haginoya, N.; Ono, A.; Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8 (3), 271-280.
39. Luedtke, G. R.; Schinzel, K.; Tan, X.; Tester, R. W.; Nashashibi, I.; Xu, Y. j.; Dugar, S.; Levy, D. E.; Jung, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (8), 2556-2559.
40. Thymine derivatives. JP A 56039089, **1981**, 6.
41. Adams, A. D. Therapeutic compounds for treating dyslipidemic conditions. US 20030125357 A1, **2003**, 33.
42. Jacobson, A. R. *J. Org. Chem* **1987**, 52, 2592-2594.
43. Miguael, S. A. Procedimiento para la obtencion de derivados de benzoiletilendiaminas sustituidas. ES419284(A1), **1976**.
44. Williamson, K. L. Synthesis of Methyl Benzoate by Fisher Esterification. In *Macroscale and Microscale Organic Experiments*, Houghton Mifflin, Boston, **2011**, p 385.

45. Nencka, R.; Votruba, I.; Hrebabecky, H.; Tloust'ova, E.; Horska, K.; Masojdkova, M.; Holy, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (5), 1335-1337.
46. Brulíková, L.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Hlaváč, J. *Carbohydr Res* **2011**, in press.
47. Holy, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1993**, *58*, 649-674.
48. Ratsino, E. V.; Radchenko, S. I. *Russ. J. Gen. Chem.* **2011**, *79* (2), 340-341.